

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

**L'AUTOLYSE MICROBIENNE TRANSMISSIBLE
OU LE BACTÉRIOPHAGE**par les D^{rs} J. BORDET et E. RENAUX.*(Institut Pasteur de Bruxelles.)*

On entend souvent dire que la question de l'autolyse microbienne transmissible ou du bactériophage est singulièrement embrouillée et que les personnes qui ne l'ont pas suivie de près ne se retrouvent pas facilement dans les théories proposées. Parmi celles-ci, il en est une, la première en date, celle de d'Hérelle, qui est fort simple. D'après d'Hérelle, le principe lytique est un agent animé, un virus extrêmement petit, vivant à l'intérieur des bactéries, et capable de traverser les filtres. Lorsqu'on l'introduit dans une suspension de microbes réceptifs, bacille dysentérique par exemple, il pénètre dans les bactéries, s'y multiplie et en provoque la lyse. En filtrant ensuite la suspension, on obtient un liquide très riche en virus, dont la moindre trace, ajoutée à une nouvelle suspension dysentérique, l'ensemence du minuscule parasite, y déclenche par conséquent la lyse, et ainsi de suite indéfiniment, de suspension à suspension. Si dans ces conditions l'agent lytique se régénère incessamment, la raison en est bien

simple : il est doué de vie, il détermine chez la bactérie une maladie qui, étant infectieuse, est naturellement transmissible.

L'autre théorie, dite théorie de l'autolyse, formellement opposée à la précédente et que Bordet et Ciuca proposèrent en 1920, se caractérise essentiellement en ce que, niant l'existence du virus de d'Hérelle, elle considère l'agent lytique comme un principe chimique non animé et en attribue la régénération à la bactérie elle-même qui se lyse ; il s'agit donc d'une autolyse transmissible. Développée dans une longue série de notes, enrichie ainsi de faits nouveaux qui permirent de la préciser davantage, récapitulée par l'un de nous en 1925 (1), cette théorie fût vivement discutée. Parfois les auteurs qui en font la critique l'exposent sinon inexactement, au moins d'une façon fragmentaire, et en rendent ainsi la compréhension moins aisée. Par exemple, Wollman (2) écrit que, d'après Bordet, les bactériophages sont des constituants normaux des bactéries. Wollman ne commet pas d'erreur, la citation est bien exacte. Mais Bordet et Ciuca ont développé d'autre part une notion qui, pour le lecteur incomplètement averti, peut sembler en contradiction flagrante avec celle que Wollman lui rappelle. Ils ont dit, en effet, que lorsqu'un principe provoque la lyse intense et typique d'une bactérie déterminée, ce principe doit être considéré, par rapport à cette bactérie, comme un élément étranger, anormal, provoquant chez elle une viciation physiologique dont la lyse est finalement l'expression. Voici donc que le principe, tout à l'heure déclaré normal, est maintenant considéré comme représentant quelque chose d'inusité et de nouveau. L'incompatibilité entre les deux notions disparaît si l'on a soin de faire ressortir que le principe, normal par rapport à la bactérie qui, primitivement, spontanément et sans en souffrir, le secrète, se comporte comme un facteur étranger et nuisible lorsque, venant s'intégrer dans la physiologie d'un microbe différent du premier, il en trouble le fonctionnement vital au point de provoquer sa destruction. Nous reviendrons sur cette distinction essentielle, mais on voit dès à présent combien il importe, avant d'aborder la partie expérimentale qui forme l'objet principal de notre mémoire,

(1) Ces *Annales*, 1925, p. 717.

(2) Ces *Annales*, 1927, p. 894.

de dissiper au préalable toute obscurité en esquissant une fois encore, dans ses traits généraux, la théorie de l'autolyse. On nous pardonnera de revenir sur des notions que l'un de nous a déjà fréquemment énoncées.

Exposé général du problème.

LA THÉORIE DU VIRUS. — L'hypothèse du virus bactériophage se heurta bientôt, sinon à des réfutations vraiment décisives, au moins à des invraisemblances d'autant plus graves qu'elles se multipliaient. Comme Kabeshima le signala le premier, le principe lytique fait preuve d'une résistance remarquable à divers antiseptiques, tels les fluorures et l'acétone. Agité pendant une semaine en tube scellé avec un excès de chloroforme, il conserve intégralement son pouvoir lytique et l'aptitude à se régénérer en présence de bactéries sensibles. A vrai dire, l'objection n'est pas péremptoire, car on connaît des virus, celui de la fièvre aphteuse par exemple, que le contact de substances telles que l'éther ne tue que difficilement. Mais, d'autre part, la résistance des principes à la conservation est pour ainsi dire absolue. En outre, ayant montré qu'on obtient aisément des sérums antilytiques en injectant aux animaux des suspensions microbiennes lysées, Bordet et Ciuca ont fait valoir, contre la théorie du virus, le fait que ces sérums peuvent encore supprimer définitivement l'activité des principes lorsqu'ils ont été chauffés vers 60°, température qui, comme on sait, abolit le pouvoir bactéricide des sérums (1).

Comme d'Hérelle l'avait reconnu, les bacilles tués par la chaleur ou les antiseptiques sont rebelles à la lyse et ne se prêtent plus à la régénération du principe. Tandis qu'une suspension en bouillon de bacilles dysentériques se clarifie sous l'action du principe approprié, le liquide reste trouble si avant l'introduction du principe la suspension a été chauffée vers 60°. Les partisans de la théorie du virus peuvent penser que celui-ci ne s'accommode pas de microbes dénaturés par le chauffage. L'idée n'a rien d'invraisemblable. Mais ce qui est

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 84, 1921 et *Bull. Soc. Roy. des Sc. Méd. et Nat. Brux.*, 1922.

plus singulier, c'est que, comme Bordet et Jaumain le signalèrent (1), les bactéries pour être lysables doivent non seulement être vivantes, mais encore être alimentées, c'est-à-dire pouvoir se reproduire. Délayées dans la solution physiologique à laquelle on ajoute un peu du principe approprié, les bactéries sensibles manquant de nourriture restent intactes et l'on ne constate point de régénération de principe. Mais il suffit d'introduire dans la suite une trace de solution concentrée de peptone pour déclencher la reproduction du principe et la lyse. En somme, si l'agent lytique est un virus, il se comporte, dans la suspension microbienne en solution physiologique, comme un tigre qui refuserait de dévorer un homme pour la raison que celui-ci a oublié de prendre son repas; pareille attitude semble peu vraisemblable. Ultérieurement, Bruynoghe, opérant sur le bacille typhique et le principe correspondant, a constaté que, même dans un bouillon bien nutritif, la régénération de l'agent lytique et la lyse font défaut lorsqu'on ajoute à ce liquide, au lieu de bacilles normaux, des bacilles qui, ayant été impressionnés par l'émanation du radium, sont encore vivants ainsi que leur mobilité l'atteste, mais ont perdu la faculté de se reproduire (2).

La notion que l'abondante régénération du principe semble liée à la multiplication des microbes réceptifs était d'ailleurs en harmonie avec une constatation relevée par divers auteurs dès le début des études sur le bactériophage. Lorsque, dans un bouillon contenant une dose minime de principe, on ensemente une goutte de culture de la bactérie sensible, on constate que pendant les premières heures celle-ci se reproduit aussi activement que dans un bouillon témoin ne renfermant pas de principe. Un trouble prononcé apparaît qui, à un moment donné, s'éclaircit brusquement. La lyse attend pour se manifester que la culture se soit développée pendant un temps fort appréciable, la phase critique de lyse est un aboutissement auquel la culture ne parvient qu'après une période de vie active, d'évolution en apparence normale (Bordet et Ciuca). Si comme Doerr et Gruninger l'ont très soigneusement

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, **85**, p. 1095, 1921.

(2) *Arch. internat. de Médec. expér.*, vol. II, p. 801.

fait (1), on procède à divers intervalles à la numération des bactéries et au titrage du principe, on constate que la quantité de celui-ci s'accroît considérablement avant la lyse, c'est-à-dire tandis que les bactéries se multiplient. Lorsque la dose de principe introduite dans le bouillon qu'on ensemence est beaucoup plus élevée, la lyse est plus précoce, la multiplication bactérienne ne s'effectue que pendant une période considérablement plus brève, elle peut même ne pas se manifester visiblement, le liquide reste limpide, et dans ces conditions la teneur en principe ne s'élève que fort peu. En somme, la régénération du principe est liée à la reproduction microbienne.

Si le principe lytique est un virus, il est corpusculaire, il doit consister en particules disséminées dans le liquide. On sait combien les partisans de la théorie du virus ont insisté sur cette constatation expérimentale que si l'on étale sur gélose un peu d'une suspension microbienne qu'on vient d'ajouter du principe approprié, le nombre des taches de clarification qui apparaissent sur la gélose après séjour à l'étuve est en relation directe avec la concentration du principe dans la suspension ensemencée. En effet, d'après d'Hérelle, une tache claire apparaît sur chaque point de la gélose où une unité virulente s'est déposée. Discutant cette question, l'un de nous, dans son article de ces *Annales*, paru en 1923, a rappelé l'idée, démontrée tout d'abord par Gratia (2), que la sensibilité au principe des divers individus microbiens présents dans une même suspension n'est pas égale, de telle sorte que l'apparition des taches en un point donné de la gélose trahit la présence en cet endroit, non seulement de principe, mais aussi de bactéries suffisamment sensibles pour en ressentir l'influence lytique. Dans le même article, l'un de nous a démontré l'influence capitale de la concentration du principe; lorsque celle-ci est relativement très faible, seuls des individus microbiens exceptionnellement réceptifs sont aptes à déceler, en se lysant, la présence de la matière active. Lorsque sur des microbes différents on fait agir en même concentration un même principe capable de les impressionner tous, mais vis-à-vis duquel ces divers germes se

(1) DOERR et GRUNINGER. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1922; DOERR. *Schweiz. med. Woch.*, 1924.

(2) C. R. Soc. de Biol., 84, 1921, p. 750.

montrent inégalement sensibles, on constate que l'étalement des suspensions sur gélose donne des nombres inégaux de taches claires. En d'autres termes, pour que deux suspensions de microbes, l'un très sensible, l'autre relativement résistant, donnent approximativement le même nombre de taches, il faut que la seconde ait reçu plus de principe que la première. On a, dans l'article cité, suffisamment insisté sur ces constatations.

Il faut reconnaître au surplus que les expériences relatives au nombre de taches claires développées sur gélose en fonction de la concentration en principe des suspensionsensemencées doivent être considérées, au moins pour ce qui concerne le problème de la nature réelle du principe, comme ayant perdu leur intérêt depuis que Stassano et de Beaufort, Wollman, ont signalé que le principe lytique manifeste une extrême filtrabilité. Le fait qu'il affecte l'état corpusculaire ne saurait être invoqué à l'appui de la théorie du virus que si ces particules étaient, sinon volumineuses, au moins de taille nettement supérieure à celle des micelles colloïdales ou des grosses molécules protéiques. Cela va sans dire, lorsqu'on oppose à la théorie du virus l'idée que l'agent lytique est un principe chimique inanimé, on ne prétend aucunement que ce soit une substance très simple en état de solution parfaite; bien au contraire, tout porte à croire qu'il est de nature colloïdale. Le chauffage vers 70° à 80° le rend inactif, probablement en le coagulant; il est précipitable par le sulfate ammonique, etc. Or, Stassano et de Beaufort (1), Wollman (2), ont montré que le bactériophage traverse des filtres en collodion acétique imperméables à l'hémoglobine et aux protéines sériques, mais qui à vrai dire laissent passer (Wollman) des protéines coagulables d'origine microbienne. Or, de tels filtrats de principe, additionnés de microbes et étalés sur gélose, reproduisent le phénomène des taches. En conséquence, celui-ci ne saurait être invoqué en faveur de la théorie du virus, puisqu'il peut être déterminé par le dépôt, en certains points de la surface nutritive, de principe à l'état de micelles ou molécules plus ténues encore que ne le sont les particules des protéines sériques. L'expérience vient simplement renforcer une idée qui d'emblée était fort vraisemblable, à savoir que le

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, **93**, 1925, p. 1378.

(2) Ces *Annales*, 1927, p. 891.

principe, ou bien (ce qui est fort probable) est en réalité un colloïde, ou bien est véhiculé par des particules colloïdales auxquelles il adhère. Bien entendu, ces expériences de filtration ne prouvent pas que le virus n'existe pas, mais elles font voir qu'on n'est pas autorisé à invoquer le phénomène des taches en faveur de la théorie du virus.

LA THÉORIE DE L'AUTOLYSE TRANSMISSIBLE. — Nous n'avons rencontré jusqu'ici, on le voit, ni forte présomption à l'actif de la théorie du virus, ni difficulté sérieuse au passif de la théorie de l'autolyse, et nous verrons que celle-ci ne fera que gagner du terrain au fur et à mesure que nous examinerons les résultats acquis. Demandons-nous tout d'abord si ses principaux éléments ne heurtent pas la logique.

La théorie implique en premier lieu que la bactérie réceptive touchée par le principe se charge elle-même de le régénérer et provoque ainsi sa propre lyse; ce principe est donc reproductible en quelque sorte automatiquement, par le fait même qu'il agit. Ce phénomène, assurément curieux, est-il invraisemblable? L'un de nous a déjà fait allusion à son analogie avec ce qui se passe dans la coagulation du sang. Lorsqu'à du sang ou à du plasma non encore coagulé on ajoute une trace de thrombine, celle-ci non seulement provoque la coagulation, mais encore déclenche très promptement la production d'une quantité additionnelle de thrombine, qui sans cette intervention n'aurait apparu que beaucoup plus lentement (Bordet et Gengou); la thrombine se régénère du fait même qu'elle agit. Des phénomènes de même ordre ont été signalés par Delezenne et Ledebt pour ce qui concerne l'activation du suc pancréatique. Dans ces exemples, à vrai dire, la reproduction de la matière active peut s'effectuer dans un liquide, tel le plasma, complètement exempt de cellules; mais rien n'interdit de penser qu'un processus analogue soit susceptible de s'accomplir à l'intérieur d'une cellule, par exemple dans la bactérie que le principe lytique impressionne.

La théorie dit ensuite que la bactérie réceptive, victime d'une viciation de sa physiologie, prépare sa propre destruction: elle se condamne à la lyse en régénérant le funeste principe; divers auteurs estiment qu'un tel processus ressemble

fort à un suicide, et qu'il n'est guère vraisemblable qu'une bactérie puisse se suicider. Mais il est exagéré d'assimiler le phénomène à un véritable suicide, car la bactérie cède à la coercition. S'il est vrai que sous l'action du principe elle participe par ses propres ressources au déterminisme qui conduit à la lyse, il est évident cependant que l'impulsion perturbatrice initiale qui déclenche le fâcheux processus vient d'un agent étranger à la bactérie, c'est-à-dire précisément du principe. Au surplus, il est acquis que les êtres vivants élaborent des matières jouant un rôle essentiel dans leur physiologie, mais qui sont tellement actives qu'elles seraient dangereuses si on les faisait intervenir à un moment inopportun, ou à dose trop forte, ou bien encore si leur composition venait, en raison d'une viciation sécrétoire due à une influence étrangère, à n'être point conforme à ce qui est requis. Nos sécrétions internes nous sont indispensables, mais il faut que notre organisme s'en serve avec prudence.

En énonçant que la bactérie qui se lyse a reproduit elle-même le principe destructeur, la théorie admet assurément qu'il s'agit d'un phénomène pathologique, puisque la bactérie en question ne régénérerait pas le principe et resterait intacte si celui-ci ne l'avait pas touchée. Il faut bien accepter néanmoins que si elle se montre capable de reproduire l'agent lytique lorsqu'elle en subit le contact, c'est que dès l'origine elle possédait les potentialités voulues pour accomplir ce travail, c'est qu'elle met en œuvre des possibilités physiologiques préexistantes. En d'autres termes, c'est dans les ressources de la physiologie bactérienne normale que le processus puise ses composants indispensables. Sous l'action du principe, la physiologie du microbe est désormais viciée, pervertie, elle se déroule pour aboutir à cette calamité qui est la lyse, mais c'est tout de même de la physiologie. On peut dès lors imaginer qu'à l'état même parfaitement normal les bactéries (ou tout au moins certaines espèces) fabriquent des substances qui ressemblent beaucoup aux principes lytiques et en possèdent les propriétés, sauf que, chez les microbes qui spontanément les produisent, elles interviennent utilement soit dans les processus vitaux de l'individu, soit dans l'évolution normale de l'espèce. Enfin, il se pourrait que ces substances ne fussent

point identiques chez les diverses espèces microbiennes, et l'on peut, dans ces conditions, concevoir que si l'on met en présence deux espèces différentes mais cependant assez voisines, le principe de l'une, s'intégrant ou s'engrénant en quelque sorte dans le fonctionnement de l'autre, trouve dans les attributs physiologiques de celle-ci les éléments de sa propre régénération, et que de plus ce même principe, normal par rapport à la première espèce dont il provient, et par conséquent inoffensif pour elle, se comporte vis-à-vis de la seconde, en raison du fait qu'il lui est étranger, comme un facteur de perturbation dont l'influence se traduit finalement par la lyse. Pour recourir à une comparaison familière, on peut supposer que deux serrures légèrement différentes soient cependant assez semblables pour que la clef de la première permette le fonctionnement de la seconde, mais que celle-ci, dans ces conditions anormales, finisse par se détériorer sous l'action de cette clef étrangère qui ne lui est pas exactement appropriée. Cela va sans dire, la comparaison ne couvre pas le phénomène entier, car, dans le cas de la lyse bactérienne, le facteur qui dérègle se reproduit du fait même qu'il agit.

Nous voici arrivés au point où nous pouvons invoquer des constatations expérimentales à l'appui de cet exposé qu'afin de le rendre plus clair nous avons conçu jusqu'ici sous forme quelque peu schématique. C'est le moment en effet de citer l'un des faits qui ont le mieux contribué à fortifier la théorie de l'autolyse, et que l'on doit à Lisbonne et Carrère (1). Ces auteurs ont trouvé dans l'eau un microbe qui, sur gélose ou en bouillon, se cultive avec luxuriance sans rien présenter d'anormal, sans subir notamment de lyse perceptible, et qui pourtant, mis en présence du bacille de Shiga, en déclenche la lyse transmissible. Ce microbe agit par ses sécrétions, car le filtrat de ces cultures en bouillon est actif; quelques gouttes de ce liquide, introduites dans du bouillon qu'onensemence de bacille de Shiga, engendrent un principe susceptible de se régénérer indéfiniment par passages sur ce même bacille, lequel, dans ces conditions, se lyse de la façon la plus caractéristique.

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 86, 1922, p. 569.

A vrai dire, les partisans de la théorie du virus ont objecté que le microbe de Lisbonne est en réalité contaminé par un parasite bactériophage. Pour expliquer qu'il donne des cultures prospères n'offrant aucun indice de lyse, ils ont allégué qu'un *modus vivendi* s'est établi entre le virus et la bactérie; il s'agirait d'un cas de symbiose ou de commensalisme. Mais l'un de nous a montré que cette objection, d'ailleurs gratuite et arbitraire, se heurte à trop d'in vraisemblances pour être soutenable. Il est aisé de démontrer notamment que, dans le cas du microbe de Lisbonne, chaque individu microbien, parfaitement lavé du liquide de culture où il baignait, et soigneusement séparé de ses congénères, garde dans son intimité l'aptitude à déclencher la lyse du bacille de Shiga, c'est-à-dire peut fournir une descendance investie de ce pouvoir lysogène, et qui, au surplus, se développe de la façon la plus normale sans manifester aucune lyse. En effet, les colonies séparées que l'on obtient sur gélose grâce à la technique de l'isolement se montrent lysogènes, elles se composent de microbes qui tous possèdent ce pouvoir, car si dès leur apparition on soumet ces colonies à la même technique d'isolement, elles fournissent de nouvelles colonies séparées douées encore de la même propriété. Or, l'isolement comporte comme on sait le lavage des microbes, l'élimination du liquide ambiant, puisque, pour obtenir des colonies bien éloignées les unes des autres, on étale sur la surface de gélose nutritive, qu'on maintient ensuite verticalement à l'étuve, une suspension extrêmement diluée des microbes. Comment ne pas reconnaître la force probante de cette expérience si simple? Serait-il raisonnable d'admettre que chaque unité microbienne contient du virus et que celui-ci se transmet régulièrement à tous les microbes nouveaux issus des divisions répétées, sans manifester d'activité pathogène visible, sans nuire au développement de la culture ni modifier son aspect? N'est-il pas évident que dans le cas du microbe de Lisbonne et Carrère (que dans la suite de cet exposé nous appellerons microbe L), le pouvoir lysogène est inhérent à la physiologie normale de cette bactérie, est inscrit dans sa trame et en est inséparable? La persistance de cette propriété, en dépit de l'isolement, est d'autant plus significative que, dans d'autres cas, dans ceux où l'activité lytique est

d'origine étrangère au lieu d'appartenir en propre à la bactérie considérée, on réussit fréquemment et sans difficulté à la faire disparaître (nous reviendrons plus loin sur ce fait) en procédant à l'isolement.

Hâtons-nous cependant de rappeler que les cultures issues de plusieurs colonies isolées du microbe L peuvent ne pas se montrer lysogènes avec la même puissance. Il est même arrivé, à un moment donné, que de telles cultures étaient si peu actives qu'on ne put déceler, sous l'influence de leurs filtrats, de lys perceptible du bacille de Shiga. C'est ainsi qu'à ce moment on crut pouvoir conclure que l'isolement éliminait le pouvoir lysogène. On reconnut plus tard (1) que ces mêmes cultures possédaient le pouvoir lysogène à l'état latent, car, après avoir été entretenues au laboratoire pendant plusieurs mois, elles finirent toutes par devenir actives, certaines se montrant plus lysogènes que d'autres. Loin de corroborer la théorie du virus, ce fait que le pouvoir lysogène offre parfois des fluctuations très appréciables concorde avec la notion de la variabilité microbienne. Nous retrouverons cette donnée dans les pages qui suivent et nous la compléterons plus loin par les résultats d'expériences nouvelles relatives au staphylocoque.

Mais il importe de formuler immédiatement cette remarque que l'exemple du microbe L ne saurait être unique. Il doit exister dans la nature de nombreuses espèces investies de propriétés analogues, c'est-à-dire capables de déclencher la lyse d'espèces microbiennes différentes, ou bien encore (nous allons voir que cette possibilité n'est pas exclue) la lyse d'autres variétés de même espèce. Sans aucun doute, ce sont de telles espèces lysogènes qui ont fait surgir le problème du bactériophage, lequel s'est posé le jour où on a pu déceler des principes actifs non seulement dans la vaccine et le contenu intestinal mais aussi, comme Dumas l'a démontré il y a longtemps déjà (2), dans le sol et dans l'eau. Pouvant émaner d'espèces bactériennes variées, ces principes peuvent corrélativement n'être pas identiques, et l'on conçoit ainsi qu'un même milieu puisse renfermer des principes distincts respectivement aptes

(1) Voir pour l'exposé de ces divers résultats : J. BORDET, *C. R. Soc. de Biol.*, 88, 1923, p. 1211, et *ibid.*, 90, 1924, p. 96.

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, 83, 1920, p. 1314.

à déclencher la lyse de microbes divers, ou même que tel milieu, actif à l'égard d'un microbe déterminé, contienne en réalité plusieurs principes qui, bien que capables tous d'attaquer celui-ci, n'ont pas la même provenance et ne se confondent point (1). Ces principes, on les a étudiés sans connaître leur origine, mais on est fondé à croire qu'ils dérivent primitivement de certaines espèces lysogènes, dont l'identification précise, cela va sans dire, serait d'un très vif intérêt. Nous relatons plus loin certaines recherches que nous avons poursuivies dans ce sens. Mais ce travail est loin d'être achevé, la filiation de la plupart des principes que les expérimentateurs ont pu se procurer reste obscure, il y a là une grave lacune à combler.

Il ne nous reste plus, pour compléter cet exposé sommaire de la théorie de l'autolyse, qu'une étape à franchir, mais elle est importante, car elle va nous conduire à des constatations de biologie générale susceptibles de nous faire pressentir la signification réelle du phénomène étudié. Nous venons de rappeler que si l'on procède à l'isolement du microbe L et repique les colonies séparées, on obtient une série de cultures filles dont le pouvoir lysogène vis-à-vis du bacille Shiga n'est pas égal. Par passages de ces cultures filtrées sur ce bacille, on trouve que certaines d'entre elles n'engendrent que des principes faibles. Comme il faut s'y attendre, le bacille de Shiga peut s'accoutumer à ces principes, mais, chose remarquable, les bacilles devenus résistants vis-à-vis des principes faibles et qui désormais en tolèrent parfaitement le contact, sont encore réceptifs par rapport aux principes plus forts fournis par la descendance d'autres colonies du microbe L. On pourrait dire que le bacille de Shiga s'équilibre exactement au principe dont il a ressenti l'influence.

Ces faits permettent déjà de conclure qu'une certaine variabilité s'était manifestée dans la culture initiale du microbe L, puisque les divers individus qui la composaient ont donné des cultures filles ne jouissant pas vis-à-vis du bacille de Shiga de pouvoirs lysogènes tout à fait identiques. Mais il y a plus. L'un

(1) Rappelons notamment les constatations de Bail (*Wien. Kl. Woch.*, 1921 et 1922), de Asheshov (*C. R. Soc. de Biol.*, 87), de Watanabe (*Zeitschr. f. Immunitätsforschung*, 37, 1923), sur la multiplicité des principes dans un même milieu. Cette question a été beaucoup étudiée par Bruynoghe et ses collaborateurs.

de nous, en 1925, jugea intéressant d'éprouver les unes vis-à-vis des autres ces cultures si étroitement apparentées, en d'autres termes de rechercher si l'une des souches ne serait pas sensible à l'influence lytique du filtrat de l'une ou l'autre des cultures congénères. L'expérience répondit affirmativement, de sorte que l'on fut autorisé à accepter désormais cette notion (1) qu'au sein d'une seule et même espèce microbienne la variabilité peut conduire à l'apparition de types assez différents pour être susceptibles d'entrer en conflit à la faveur de leurs pouvoirs lysogènes respectifs. Parmi les cultures issues de ces types divers, certaines sont sensibles au principe que d'autres élaborent, et corrélativement se montrent capables de le régénérer. Le phénomène de la lyse transmissible, qui nous apparaissait jusqu'ici comme trahissant l'interréaction de deux espèces différentes, se révèle maintenant, à la lumière de ces constatations, comme pouvant être aussi l'expression de relations particulières qui s'établissent entre microbes de même espèce, lesquels, bien que dérivant tous d'un ancêtre commun, ont acquis cependant, au cours des générations successives, une individualité qui les distingue et leur permet de réagir entre eux. C'est à cette notion dominante que l'investigation aboutit, et l'on verra que nos recherches récentes relatives notamment à l'origine du principe lytique antistaphylococcique lui apportent une solide confirmation.

Lorsque parmi ces cultures, qui toutes appartiennent à l'espèce L, l'une d'entre elles, A, grâce à son propre principe, en impressionne une autre B, celle-ci régénère le principe en question; une période de lyse prend cours, brève d'ailleurs, car promptement des microbes résistants apparaissent. Comment se comportent-ils? Fait remarquable, ces résistants (2)

(1) Nous renvoyons pour les détails à l'article paru dans ces *Annales* en 1925, p. 758 à 761, et croyons superflu d'insister encore sur la notion développée dans cet article, que ces résultats ne sont pas compatibles avec la théorie du virus.

Dans la suite, Béguel (*Arch. Inst. Pasteur d'Alger*, 5, 1927, p. 25) observa un fait analogue en opérant sur des colonies issues d'une même culture de bacille de Shiga. A vrai dire, en répétant son expérience, nous n'obtinmes pas le résultat annoncé. Mais nous n'avons pas employé sa culture, et il est évident que diverses cultures n'ont pas forcément les mêmes propriétés. Par exemple, parmi les cultures du microbe L, dont il est question ici, il en est, bien entendu, qui n'agissent pas l'une sur l'autre.

(2) Comme il est signalé dans l'article de ces *Annales*, 1925, ces résistants

qui procèdent du type B et naissent sous l'action du principe sécrété par le type A, acquièrent précisément, pour ce qui concerne le pouvoir lysogène, les caractères de cette variété A, dont ils adoptent les propriétés et à laquelle ils sont en quelque sorte contraints de s'identifier (1). On pourrait dire qu'il s'agit d'un redressement ayant pour effet de ramener au type dominant (représenté dans le cas présent par la variété A) les individus microbiens (variété B) qui manifesteraient quelque tendance à s'en écarter. Il semble bien, en de telles circonstances, que le pouvoir lysogène joue un rôle dans le maintien des caractères de l'espèce, et contribue à assurer ce qu'on pourrait appeler la discipline spécifique. La remarquable faculté qu'il possède d'inciter la bactérie à le reproduire le rend spécialement apte à assumer pareille tâche. S'il est permis de rappeler une comparaison peut-être un peu hardie que Bordet et Ciuca invoquaient en 1920, les choses se passent un peu comme si des rails chargés de conduire une locomotive à son but en l'empêchant de dévier se reproduisaient incessamment devant elle. On doit songer aussi, à ce propos, aux constatations de E. Burnet concernant l'entraînement des races bactériennes, phénomène fort intéressant et qui vraisemblablement (conformément d'ailleurs aux vues exprimées par l'auteur de ce remarquable travail) (2) est justiciable d'une interprétation analogue.

Ces faits relatifs au microbe L venaient corroborer fort utilement les données déjà signalées par l'un de nous concernant l'influence transformatrice que les principes peuvent exercer sur les cultures réceptives. On sait (Baerthlein, Arkwright) que les cultures du groupe coli-typhique (comme d'autres espèces d'ailleurs, ainsi que Preisz l'avait constaté il y a longtemps à propos du charbon) peuvent donner lieu à l'apparition de deux types que l'on peut appeler B (bombé) et P (plat), que les

présentent, circonstance favorable à l'étude, une forme particulière qui permet de les reconnaître et qui témoigne de l'influence modificatrice exercée par le principe en jeu.

(1) Par exemple, on constate que les cultures du microbe L qui se montrent sensibles au principe lytique de leurs congénères sont celles qui impressionnent le plus faiblement le bacille de Shiga, mais que, en s'adaptant à ce principe, elles acquièrent corrélativement, vis-à-vis du bacille de Shiga, un pouvoir lytique semblable à celui des congénères qui les ont impressionnées.

(2) E. BURNET, Actions d'entraînement entre races et espèces microbiennes. *Arch. Inst. Pasteur de Tunis*, 14, 1925, p. 384.

auteurs anglo-saxons désignent respectivement par les lettres S (smooth) et R (rough), et qui se distinguent nettement non seulement par l'aspect des cultures en bouillon (B produit un trouble homogène, tandis que P donne des flocons qui se déposent) ou des colonies sur gélose (celles de B sont bombées, circulaires, assez lisses et luisantes, celles de P étant plates, de forme irrégulière et plus rugueuses), mais aussi par les qualités antigéniques (Arkwright) (1). Partant d'un principe capable de lyser très énergiquement le bacille coli, on peut, par des procédés très simples (2), obtenir aux dépens de ce principe puissant un principe se comportant comme s'il était beaucoup plus faible, c'est-à-dire ne déterminant qu'une lyse passagère bientôt suivie de l'apparition de germes résistants. Or, on trouve que ces résistants appartiennent exclusivement au type P; sous l'action d'un tel principe, le type B, réceptif à la lyse, a été complètement éliminé. Bien plus, si l'on fait agir le principe sur le type B tout récemment isolé, c'est-à-dire bien pur, on trouve qu'en quelques heures le type P prend naissance aux dépens de B qui disparaît. On savait que, spontanément, par le simple entretien des cultures, B peut restituer P, mais dans les conditions normales cette transformation reste partielle et ne s'accomplit que lentement. Elle s'effectue radicalement et promptement sous l'action du principe faible dont il vient d'être question. Ainsi fut corroborée la notion que les principes peuvent se comporter efficacement comme des agents modificateurs des cultures, d'abord parce qu'ils favorisent la prédominance des types microbiens qui leur résistent le mieux, ensuite parce que les types primitivement réceptifs peuvent, sous l'action du principe, se montrer aptes à subir rapidement la métamorphose d'où surgit le type plus résistant. Gratia (3) compléta ces données de façon très intéressante en démontrant d'autre part l'existence d'un principe en quelque sorte opposé au précédent, c'est-à-dire lysant de préférence le type P. Quand les deux principes se rencontrent dans le même liquide, celui-ci, naturellement, se comporte vis-à-vis du bacille coli comme un principe très fort, puisqu'il peut lyser les deux

(1) *Journ. of Pathol. and Bacteriol.*, 24, 1921.

(2) J. BORDET. *C. R. Soc. de Biol.*, 87, 1922, p. 987.

(3) *C. R. Soc. de Biol.*, 89, 1923, p. 821 et 824.

variétés. Cet auteur a établi de plus que les deux principes correspondent à ceux que Bail et Asheshov avaient antérieurement différenciés en tenant compte de l'aspect des taches de clarification sur gélose. C'est le principe actif sur B qui donne lieu à de grandes taches, tandis que le principe approprié à P fait apparaître des taches plus petites. De nouvelles observations (1) sont venues compléter ces données, lesquelles projettent une réelle clarté sur la question de la multiplicité des principes dans un même liquide lytique.

Qu'un même liquide, tel un filtrat de contenu intestinal ou d'eau polluée, puisse renfermer plusieurs principes bien distincts, la théorie de l'autolyse l'explique très aisément, comme nous l'avons rappelé plus haut, en tenant compte de ce que, dans de pareils milieux, ont pu se trouver des espèces microbiennes nettement distinctes, rien ne s'opposant d'ailleurs à ce que des principes de provenance diverse puissent attaquer une même espèce bactérienne, ni à ce qu'un principe unique puisse attaquer des espèces différentes. En réalité, grâce notamment aux recherches de Bruynoghe et de ses collaborateurs, qui ont fréquemment recouru à la spécificité des sérums antilytiques pour identifier les principes, il est acquis que, dans un liquide lytique donné, on peut trouver des principes qui sont restés distincts même si l'activité du liquide a été fréquemment régénérée par des passages répétés sur la même espèce bactérienne. En dépit des passages sur cette espèce unique, leur individualité se maintient au moins pendant un temps assez prolongé, leur autonomie semble assez persistante. Il en résulte évidemment qu'une même espèce bactérienne est douée de potentialités multiples, puisqu'elle peut régénérer l'un ou l'autre de ces principes. Soit dit en passant, Bruynoghe estime qu'une telle abondance d'aptitudes chez une seule et même espèce n'est guère vraisemblable, et c'est pourquoi le fait de la conservation de l'autonomie des principes à travers des passages répétés porte ce savant à se ranger parmi les partisans de la théorie du virus. Pourtant, ce fait se conçoit aisément dès que l'on tient compte de l'hétérogénéité des cultures, lesquelles peuvent

(1) Par exemple, ARKWRIGHT (*Brit. Journ. of Exper. Pathol.*, 5, 1924) a signalé un principe spécialement actif sur le type P du b. dysentérique. WOLLMAN (ces *Annales*, 1927, p. 901) mentionne un principe actif sur le type P du *B. coli*.

comprendre plusieurs types dont chacun est spécialement apte à ressentir les effets d'un principe déterminé et à le régénérer; ne venons-nous pas de rappeler que deux principes donnant lieu, l'un à de petites taches, l'autre à de grandes, impressionnent respectivement les types P et B du *B. coli* (1)? A la mosaïque des principes peut correspondre, dans la culture, une mosaïque de types microbiens. Remarquons-le, cette notion s'harmonise avec les données fournies par la sérologie; tous les individus microbiens peuplant une culture pure ne possèdent pas nécessairement les mêmes caractères antigéniques. Par exemple, les types B et P se différencient sérologiquement (Arkwright), de même qu'ils se distinguent par leur comportement vis-à-vis des principes (2). L'ensemble des constatations permet de croire que, comme les anticorps, les principes témoignent d'une électivité réelle, chacun d'eux trouvant dans la culture un type adéquat, spécialement apte à subir son influence et à le reproduire, et y trouvant aussi, d'autre part, des types capables de lui résister. Et c'est pourquoi l'on constate, si l'on fait agir des principes différents sur une même espèce, qu'au sein de celle-ci les types capables respectivement de leur résister ne sont pas identiques. Nous relaterons plus loin, à ce sujet, des expériences spécialement démonstratives. A vrai dire, cette étude de l'unité ou de la multiplicité des principes dans un même liquide n'a pas été poursuivie dans des conditions irréprochables; elle a souffert sensiblement du fait que, dans la plupart des cas, la provenance de ces principes était inconnue, et spécialement de ce que, en général, on ne pouvait savoir si l'activité des liquides étudiés leur avait été originellement communiquée par les sécrétions de plusieurs

(1) Mais il va sans dire que les individus microbiens peuvent différer autrement que par l'aspect de leurs cultures, et qu'on ne doit pas forcément s'attendre, pour toutes les espèces microbiennes, à une correspondance absolument régulière entre les caractères de cet ordre et le comportement vis-à-vis des principes. Cette remarque très juste a été exprimée notamment par Wollman.

(2) Le sérodiagnostic qui distingue les types B et P tels qu'ils apparaissent normalement dans les cultures de *B. coli* distingue semblablement ces deux types lorsque P a apparu aux dépens de B sous l'action du principe dont il est question ci-dessus (Mc KINLEY, *C. R. Soc. de Biol.*, 93, 1925, p. 1052). Pour cette question des rapports entre la sensibilité aux principes et les caractères sérologiques, voir aussi: HADLEY, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 23, 1926, p. 443, et F. M. BURNET, *Brit. Journ. Exper. Pathol.*, 8, 1927, p. 121.

espèces bactériennes ou d'une seule. On conçoit qu'il serait curieux de rechercher si, en faisant agir à plusieurs reprises un principe unique, sûrement pur, sur une espèce donnée, on n'observerait pas finalement, en raison de l'intervention, dans la régénération de ce principe, de ces types quelque peu différents dont la variabilité microbienne permet l'apparition, une certaine tendance de l'agent lytique à se diversifier. Ainsi se percevrait bientôt une réelle hétérogénéité du principe, correspondant à l'hétérogénéité de la culture elle-même et qui en serait le reflet. Pareille éventualité n'est pas invraisemblable, tant s'en faut. En effet, le principe faible dont il vient d'être question, et qui agit sur le type B du *B. coli*, a été obtenu dans des conditions telles qu'on est fondé à le croire pur. Or, si on lui fait subir de nombreux passages sur la culture totale du *B. coli*, on constate que sa puissance augmente et qu'il finit par attaquer visiblement aussi le type P. Des faits de ce genre, relatifs à l'accroissement d'activité des principes faibles, ont été signalés également par Brutsaert (1). Au surplus, c'est en invoquant cette notion de la présence dans une même culture de plusieurs types dont certains sont plus aptes que d'autres à réagir avec tel principe et à le reproduire, qu'on peut comprendre le fait, acquis depuis longtemps, que l'activité d'un principe pour une espèce donnée s'exalte au cours des passages répétés sur celle-ci. Selon toute probabilité, en effet, entre ces divers types existent des intermédiaires susceptibles d'assurer les transitions, de permettre au champ d'action du principe de s'élargir en s'étendant plus aisément, au cours des passages, d'un type microbien à un autre (2), au point d'englober les diverses variétés possibles, de telle sorte que le principe, atteignant désormais l'ensemble de la culture, apparaît plus puissant, en d'autres termes, mieux adapté. Wollman (3) signale qu'en s'accoutumant à une nouvelle espèce bactérienne un principe peut corrélativement devenir moins actif vis-à-vis de

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 89, 1923.

(2) On trouvera plus loin, à propos des principes antistaphylococciques, une nouvelle démonstration expérimentale de cette notion déjà développée dans notre article de ces *Annales*, 1925.

(3) Ces *Annales*, 1927, p. 889 et 890, p. 898 et 899. Concernant la valeur des procédés employés pour caractériser les principes, on verra notamment dans ce travail que deux principes qui sérologiquement paraissent identiques peuvent cependant se distinguer par les bactéries qu'ils sont capables de lyser.

l'espèce sur laquelle on l'entretenait tout d'abord. En résumé, s'il est vrai que l'individualité des divers principes se montre assez persistante, on ne peut affirmer qu'elle soit d'une permanence absolue, leurs caractères ne semblent pas aussi immuables que le pense Bruynoghe.

Le fait, constaté à propos du microbe L, qu'au sein d'une même espèce des types différents peuvent apparaître, dont l'un est capable de lyser l'autre, prête encore à d'autres considérations. Bordet et Ciuca, Lisbonne, Boulet et Carrère ont constaté, en soumettant des microbes au contact d'exsudats leucocytaires, l'apparition de principes. La vaccine, qui fournit aisément un principe antistaphylococcique, est un exsudat leucocytaire riche en staphylocoques. En ponctionnant un abcès de la face, Gratia a trouvé dans le pus un principe actif sur cette même espèce. Il n'est pas déraisonnable de suggérer, pour expliquer ces faits, l'hypothèse que les leucocytes, soit en favorisant les phénomènes de variabilité microbienne, soit simplement en opérant une sélection, assureraient l'intervention de types microbiens spécialement aptes à lyser leurs congénères (1).

Enfin, à propos du principe faible ci-dessus mentionné qui agit électivement sur le type B du *B. coli*, il est une réflexion qui s'impose. Ce principe ne provoque qu'une lyse éphémère, précisément parce qu'il permet le développement à bref délai de l'autre type microbien P. Si ce dernier pouvait apparaître un peu plus vite encore, et si de plus il était moins aisément reconnaissable, on ne s'apercevrait de rien, la lyse serait tellement passagère et la modification subie par la culture si peu décelable que le phénomène passerait insoupçonné. Il est à présumer qu'une telle éventualité peut en réalité se produire, et que, en particulier, les réactions d'ordre lytique entre microbes de même espèce et même celles qui s'établissent entre espèces différentes doivent échapper souvent à l'investigation. Nous ne saisissons que les cas spécialement favorables, pour l'étude desquels nous disposons d'une espèce suffisamment

(1) Cette interprétation a été proposée par l'un de nous il y a déjà longtemps, elle est rappelée dans l'article de ces *Annales*, 1923, et il est difficile de comprendre pourquoi dans un travail récent (*Bull. de l'Institut Pasteur*, janvier 1928), Wollman s'abstient d'en tenir compte lorsqu'il émet l'avis que notre théorie ne saurait expliquer le rôle des leucocytes dans l'obtention du principe.

réceptive, capable de révéler clairement le phénomène. Si nous n'en connaissons point qui puisse servir ainsi de détectrice, le processus reste dans l'ombre (1)

Que faut-il pour qu'un microbe se comporte comme un bon détecteur de principe? Il faut naturellement tout d'abord qu'il en subisse l'influence assez profondément pour que la lyse ne soit pas presque aussitôt masquée par la croissance de germes résistants. Mais un cas bien particulier se présente lorsqu'il s'agit d'espèces dont les cultures manifestent, dans certaines conditions, au bout d'un temps plus ou moins long et d'une façon plus ou moins prononcée, des phénomènes de lyse spontanée que l'on suppose être dus à la sécrétion, par cette espèce même, d'un principe lytique. Comme il est logique de le faire, on éprouve, en pareil cas, sur de nouveaux microbes de même espèce, l'activité du filtrat de ces cultures lysées. Or, dans ces conditions, on risque de méconnaître l'influence du principe et notamment la transmissibilité du phénomène, pour la raison bien évidente que les germes mis en jeu pour révéler ce principe sont, par définition, capables de l'élaborer par leurs propres moyens, et peuvent, en conséquence, se comporter à peu près de la même façon si on ne leur ajoute pas le filtrat ou si on les mélange à celui-ci. Peut-être est-ce parce qu'on n'a pas suffisamment apprécié ces données du problème qu'on a parfois dénié toute parenté entre l'autolyse transmissible proprement dite et les phénomènes de lyse spontanée auxquels certains microbes sont sujets et dont la transmissibilité n'a pu être démontrée?

Comme Preisz l'a noté il y a déjà bien longtemps dans sa remarquable étude de la morphologie de la bactérie charbonneuse, les cultures sur gélose de certains microbes se parsèment parfois, au bout d'un certain temps, de taches de clarification généralement arrondies et bien délimitées dont la ressemblance avec celles que les principes lytiques font apparaître est vraiment surprenante. Cette analogie aussi énigmatique que frappante préoccupe à bon droit les chercheurs,

(1) Comme détecteur, le b. dysentérique a rendu des services signalés; il ne révèle toutefois qu'un nombre limité de principes; nous signalerons plus loin par exemple un principe extrait d'une eau potable et qui, sans impressionner aucunement le b. dysentérique, agit énergiquement sur le *B. coli*.

et il n'est pas interdit de penser que peut-être dans ces taches spontanées réside tout le mystère du rôle physiologique des principes lytiques. Mais jusqu'ici le sens de ces taches claires n'a pu être éclairci. Sans doute quelque phase importante de l'évolution microbienne se déroule t-elle en ces points. Divers auteurs, Hadley (1) particulièrement, ont émis à ce propos des vues assurément intéressantes. Mais si plausibles qu'elles soient, les considérations de ce genre ne prendront de valeur effective que le jour où elles pourront s'appuyer sur des résultats expérimentaux convaincants. Jusqu'à présent, l'investigation n'a pu démontrer péremptoirement l'existence, au niveau de ces taches, de quelque propriété spéciale. Il est probable qu'un réel progrès sera accompli lorsque les tentatives poursuivies dans cette direction seront couronnées de succès.

Que les principes exercent une influence directrice sur l'évolution et la destinée des espèces microbiennes, c'est l'idée que l'un de nous défend depuis des années et qu'on trouve énoncée déjà en 1920 dans le premier travail qu'il publia avec Ciuca. Nous avons rappelé, dans les pages précédentes, divers faits expérimentaux qui la confirment, notamment qu'un principe peut transformer la race B du *B. coli* en race P, ou bien encore qu'au sein d'une même espèce un type microbien peut, grâce au principe qui lui est propre, contraindre un autre type à adopter ses propres qualités et spécialement à sécréter cette même substance active. Le principe tend donc à assurer la transmission de certains caractères, et corrélativement le maintien ou la prépondérance de certaines races, soit que ces types se retrouvent déjà couramment dans les conditions habituelles et normales, soit que la variabilité en ait permis l'apparition spontanée ou due à l'action d'une cause perturbatrice. Par exemple, si dans une culture surgit à un moment donné un type capable de sécréter un principe particulier ou d'énergie inusitée, un retentissement se produira sur les microbes congénères qui ainsi pourront se trouver modifiés. Bordet et Ciuca ont fait remarquer que le principe est d'autant plus apte à remplir un tel rôle, qu'il se régénère du fait même qu'il agit, et que de plus il peut se répandre dans le milieu ambiant.

(1) Philip HADLEY, The Twort-d'Hérelle Phenomenon. *Journal of infectious diseases*, vol. XLII, n° 4, 1928.

Reproductible en quelque sorte automatiquement, il ne court pas le risque, tandis que la multiplication bactérienne s'effectue, de perdre par dilution son énergie première en se distribuant sur une postérité de plus en plus nombreuse. Diffusible dans le liquide nutritif, il peut se porter au contact d'autres individus bactériens, réagir avec eux en leur conférant les particularités qu'il est capable d'imprimer.

Étant donné le peu qu'on sait, il n'est guère possible, nous semble-t-il, d'atteindre une précision plus grande au sujet de ce rôle des principes dans l'hérédité microbienne, et nous devons avouer que les vues récemment développées à ce propos par Wollman ne nous paraissent rien ajouter d'essentiel à ce que nous venons de rappeler. Ce savant écrit que les principes se comportent comme des facteurs d'hérédité capables d'assurer le transfert des caractères par le milieu extérieur. On peut évidemment traduire de cette façon ce que Bordet et Ciuca ont énoncé (1). Il y a cependant quelque chose de plus, ou pour mieux dire, d'un peu différent, dans la thèse de Wollman (2). Pour Bordet et Ciuca, la matière active encore bien mystérieuse que l'on dénomme principe est une sorte d'outil contribuant (à côté vraisemblablement d'autres facteurs, car il serait téméraire sans doute d'affirmer que dans le domaine de l'hérédité le principe est l'agent exclusif investi d'un pouvoir absolu) à assurer la transmission tout au moins de certains caractères, mais il n'est pas à proprement parler le véhicule de ces propriétés. S'il semble en être le porteur et les communiquer, c'est parce qu'il agit sélectivement, en favorisant tel type microbien qui les

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 83, 1920, p. 4293. Une erreur d'impression dans ce passage se trouve corrigée p. 277 des *C. R. Soc. de Biol.*, 84, 1921.

(2) WOLLMAN. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 26, janvier 1928.

Ajoutons que nous ne comprenons guère pourquoi, dans ce même article, Wollman range notre théorie parmi les « théories diastasiques ». On est bien obligé d'octroyer au principe l'épithète de lytique, puisque son effet le plus évident est de déterminer la lyse. Mais nous n'avons jamais dit qu'il fût directement et immédiatement lytique à la façon d'une diastase. Bien au contraire, nous avons maintes fois énoncé qu'il engendre (ou, comme nous disons de préférence, qu'il induit) chez le microbe réceptif une perturbation aboutissant à l'autolyse, et avons signalé que celle-ci est précédée d'une période de multiplication en apparence normale; c'est pourquoi, comme nous l'avons constaté, le microbe doit être alimenté pour pouvoir se lyser sous l'action du principe, tandis que vraisemblablement il ne devrait pas l'être si le principe était une diastase dissolvante. On le voit, Wollman nous attribue une opinion qui est le contraire de la nôtre.

possède déjà ou est doué des potentialités voulues pour les acquérir lorsqu'il subit son influence. Pour Wollman, on peut spécifier plus clairement ce que le principe est en réalité. Au lieu de se borner à énoncer, comme les auteurs précédents, qu'il est un instrument au service de l'hérédité des caractères, Wollman croit que le principe est vraiment lui-même un caractère, qu'il est, en d'autres termes, le support matériel d'une qualité héréditaire. Il semble donc que le principe, d'après Wollman, serait à rapprocher des éléments nucléaires qui dans la reproduction sexuée véhiculent, pour les transmettre aux descendants, les caractéristiques des parents, et dont le comportement fut si bien étudié grâce aux lois de Mendel. Sans être dénuée d'intérêt, une discussion de cette conception serait, il faut le reconnaître, un peu oiseuse et entachée de verbalisme, puisque les considérations émises par Wollman, si elles s'efforcent de trouver des analogies plus ou moins saisissables dans des domaines éloignés tel le mendélisme, ne s'appuient sur aucun résultat nouveau en rapport direct avec le sujet et susceptible en conséquence de les justifier, tandis que Bordet et Ciuca se sont contentés de traduire en langage courant, sans chercher à en dépasser la signification immédiate ni à les compliquer d'hypothèses, les faits que l'expérience révèle.

Tout d'abord, si les principes sont vraiment des propriétés héréditaires matérialisées, on ne comprend guère pourquoi ils peuvent déclencher des processus lytiques. Ensuite, il convient de ne point oublier qu'il s'agit de microbes, c'est-à-dire d'êtres chez lesquels on n'a pas décelé jusqu'ici de reproduction sexuée, et que celle-ci en somme est une complication, un perfectionnement signalé par des artifices dont le raffinement a pour but l'équitable répartition, à la progéniture, des particularités propres à chacun des parents. Or, on a souvent et justement fait observer que, trop exclusivement préoccupés de la reproduction sexuée, certains savants étaient autrefois trop enclins à faire de l'hérédité, sinon un attribut vital tout à fait autonome et distinct, au moins une puissance particulière assez indépendante et ne se confondant guère avec les autres manifestations de la physiologie. Pourtant, la physiologie de l'individu n'est au total qu'une habile perpétuation de son équilibre, qu'une restauration de son agencement et de son méca-

nisme, qui, toujours fidèle au plan primitivement tracé, est toujours prête à s'opérer et s'accomplit d'ailleurs incessamment, et semblablement l'hérédité, si l'on fait abstraction du phénomène sexuel en ne voyant en elle que l'élément morphogénétique, n'est qu'une régulation qui, également conforme au plan, se prolonge au cours d'innombrables divisions cellulaires en les disciplinant. Certes, il est merveilleux que le descendant soit l'image de l'ancêtre, mais il est également remarquable qu'un être qui vient de se constituer puisse, en dépit du métabolisme constant, de l'usure, des causes inévitables de détérioration, maintenir durant sa vie entière, grâce à des réactions cellulaires mutuelles toujours soumises au contrôle de la tradition spécifique, l'intégrité de ses fonctions et de sa forme. Et lorsqu'un traumatisme se répare, ou lorsque chez certains animaux un membre coupé se régénère en reproduisant avec un respect scrupuleux les particularités du tronçon amputé, c'est de la physiologie qui fait de la morphogenèse, et dont, en pareille occurrence, le travail ne diffère pas essentiellement de celui qu'on observe lorsque l'œuf évolue en fœtus.

Or, bien plus visiblement encore, lorsqu'il s'agit de microbes, ce qu'on appelle assez abusivement hérédité n'est que la continuation, n'est que le déroulement indéfini, à travers les divisions répétées, d'une physiologie purement individuelle qui, elle aussi (sauf toutefois certains écarts qui nous autorisent à parler de variabilité), maintient avec soin les traditions de l'espèce. Naturellement, on ne peut guère se dispenser, lorsqu'on parle d'une culture qui se développe à l'étuve, de dire que les germesensemencés donnent une postérité, qu'il y a des ancêtres et des descendants, que des uns aux autres les caractères se lèguent et qu'il s'agit d'hérédité. Mais ce langage est mal approprié et propre à nous induire en erreur. On ne doit pas se laisser fasciner ou suggestionner par les mots, serviteurs tyranniques auxquels on obéit autant qu'on leur commande. En réalité, dans la culture, l'individu microbienensemencé se borne à assimiler des matériaux nutritifs, puis se divise en deux fragments, lesquels refont ensuite et fort exactement le travail précédent. Un tel processus ne comporte évidemment ni ancêtres, ni descendants, ceux-ci n'étant que des ancêtres qui se sont disséminés par scission, tandis qu'ils

s'accroissaient. On pourrait presque dire que la culture après s'être troublée ne contient néanmoins encore qu'un seul individu microbien, infiniment divisé. Sans insister davantage, on ne peut que souscrire à ce propos aux judicieuses remarques de Van Loghem (1) déjà exprimées par Weismann, en faisant ressortir combien il serait téméraire de transporter dans le domaine bactériologique des considérations tirées de l'étude de la reproduction sexuée. Mieux vaut, à propos des principes, se borner à dire que, grâce notamment à leur diffusibilité qui leur permet d'agir à distance, ils canalisent de quelque façon l'évolution des cultures en favorisant le maintien de certains caractères ou en imprimant aux microbes des modifications que nous pouvons percevoir. On conçoit sans peine que la reproduction sexuée exige, pour que les qualités individuelles des deux ascendants soient régulièrement et fidèlement léguées, que ces caractères se concrétisent en un substrat matériel spécial et très défini susceptible d'être également partagé. Mais en l'absence de sexualité, par exemple chez les microbes, rien ne démontre que la faculté de perpétuer les caractères de l'espèce soit aussi strictement localisée ; peut-être de très nombreuses substances (sinon l'ensemble de la matière vivante dans toute sa complexité), tels les principes lytiques, collaborent-elles à cette transmission des qualités spécifiques, sans qu'on puisse aller jusqu'à dire que l'un de ces agents représente, à proprement parler, le support matériel exclusif de telle propriété. Au surplus, même pour ce qui concerne la reproduction sexuée, plusieurs embryologistes éminents, et notamment Brachet, estiment qu'à côté des facteurs mendéliens des facteurs cytoplasmiques, sans doute fort complexes, jouent un rôle peut-être encore plus important, surtout pour la conservation des caractères fondamentaux de l'espèce.

Enfin, répétons-le, les considérations de Wollmann, ingénieuses assurément, sont d'ordre spéculatif et sans connexion suffisante avec les données objectives propres au sujet qui nous occupe.

Tels sont les points essentiels qu'il y avait lieu de passer en revue à propos de la théorie de l'autolyse. Mais il est des

(1) *Centralbl. f. Bakteriol.*, 88, 1922.

aspects du problème sur lesquels il convient d'insister encore quelque peu, notamment les modalités du pouvoir lysogène et le rôle des sels calciques.

Le pouvoir lysogène et ses modalités.

Dans l'exposé général qui précède, nous avons rappelé des faits montrant que le pouvoir lysogène peut se manifester dans des conditions diverses. Il n'a pas toujours la même signification, ni le même comportement; il y a lieu de tenir compte d'une distinction sur laquelle l'un de nous a beaucoup insisté (1). Des microbes sensibles, ensemencés dans un bouillon contenant un peu de principe, se multiplient pendant un certain temps et régénèrent le principe avant de se lyser; durant cette phase, ils manifestent donc le pouvoir lysogène. Il s'agit évidemment en pareil cas d'un pouvoir lysogène qui n'est pas spontané, ayant été déclenché par la trace de principe ajoutée au bouillon. On peut donc le définir en disant qu'il est provoqué, contraint, ou mieux encore, induit. Rappelons en passant que pour mettre en branle l'activité lysogène du microbe soumis à son influence le principe doit se trouver dans le liquide ambiant à une concentration qui varie selon la nature du microbe ou du principe, et qui est plus élevée s'il s'agit de microbes relativement peu réceptifs au principe employé (2).

La notion des germes résistants fut très vite recueillie. En général, les individus microbiens soumis à l'action d'un principe ne périssent pas tous, un phénomène de sélection ou d'adaptation (3) permet à certains d'entre eux de se multiplier plus ou moins activement, de sorte que le liquide éclairci se trouble dans la suite et donne lieu, lorsqu'on le repique sur gélose, au développement d'une culture. Si l'on fait subir à

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 93, 1925, p. 1054.

(2) Pour ce qui concerne l'influence fort importante de la concentration, nous renvoyons le lecteur à l'article de ces *Annales*, 1925, p. 735 à 738.

(3) Etant donné une culture normale, sensible à un principe donné. Gratia a le premier signalé que, si l'on pratique l'isolement et repique une série de colonies séparées, on obtient des cultures filles dont certaines sont très nettement moins sensibles que d'autres à l'action de ce principe.

celle-ci de nombreux passages sur gélose, en ensemençant en masse de façon à obtenir un gazon microbien continu, le pouvoir lysogène se perpétue régulièrement dans les cultures successives, ainsi que Bordet et Ciuca l'ont reconnu (1). Mais il faut tenir compte de ce que, dans de telles conditions, l'on transporte toujours d'une culture sur la suivante, non seulement des microbes, mais aussi une dose notable de principe. En effet, parmi les bactéries qui apparaissent incessamment au cours de la multiplication, il en est un certain nombre qui, étant plus sensibles au principe que la majorité de leurs congénères, peuvent se montrer aptes à réagir avec lui et à le reproduire. Cette technique ne permet donc pas de savoir à quoi les individus microbiens vraiment réfractaires doivent leur invulnérabilité. Sont-ils encore le siège de la production du principe sans qu'ils en ressentent désormais les effets pernicioeux? Ou bien sont-ils parvenus à s'en débarrasser, s'abstiennent-ils dorénavant de le régénérer? Comme il s'agit d'un pouvoir lysogène induit, c'est la seconde hypothèse qui *a priori* semble la plus probable. En effet, l'espèce microbienne en question ne fabriquait pas le principe en jeu comme le microbe L produit le sien, c'est-à-dire spontanément, en vertu d'aptitudes inhérentes à l'espèce, et corrélativement sans en souffrir. C'est par contrainte qu'elle le régénérerait, sous l'impulsion de ce même principe, lequel, de provenance étrangère, avait été introduit dans le liquide ambiant. On peut prévoir ainsi qu'en extrayant de cette ambiance les bactéries devenues résistantes, c'est-à-dire en obtenant, grâce à la technique de l'isolement, des colonies séparées qu'on repique, on trouvera sans difficulté des germes non lysogènes. Or, c'est bien dans ce sens que l'expérience répond. Bordet et Ciuca (2), puis, peu après et indépendamment, Bruynoghe et Maisin (3), ont montré qu'on peut aisément isoler, d'une suspension qui a manifesté la lyse, des microbes résistants non lysogènes (4). On ne doit

(1) Rappelons que dans le cas d'un principe agissant sur le *B. coli* ces auteurs ont noté que la couche microbienne affecte fréquemment un aspect particulier : elle devient très épaisse, filante et muqueuse.

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, 84, 1921, p. 747.

(3) *C. R. Soc. de Biol.*, 84, 1921, p. 847.

(4) Cela va sans dire, la proportion des colonies qui se comportent comme résistantes et non lysogènes est susceptible de varier selon les conditions

pas s'étonner de ce que ce résultat ait été fréquemment consigné, puisque les études de bactériophagie ont été suggérées par la constatation de lyses très énergiques, revêtant en d'autres termes un caractère pathologique très accentué, et dans lesquelles c'est le pouvoir lysogène induit qui manifestement entre en jeu. On conçoit que dans de telles conditions l'espèce réceptive, contrainte de reproduire un principe étranger (1) qui se concilie trop difficilement avec sa physiologie normale et qui lui est trop préjudiciable, se trouve souvent dans l'impossibilité, quelles que puissent être la souplesse de ses capacités adaptatives ou les ressources de sa variabilité, de faire surgir un type nouveau doué à la fois de l'insensibilité au principe et de la faculté de le régénérer. En pareil cas donc, seuls auront des chances de pouvoir se multiplier avec luxuriance les germes

de l'expérience. Le nombre des microbes résistants qui poussent secondairement dans les suspensions additionnées de principe est plus ou moins élevé selon les microbes et selon les principes. S'il est faible, c'est-à-dire si, le principe étant très puissant, la suspension est restée fortement clarifiée, l'isolement fournira, à côté de quelques colonies bien résistantes, des colonies chétives, visiblement malades, et qui corrélativement contiennent encore le principe. On peut même trouver quelques colonies d'aspect normal, exemples de principe, mais qui donnent par repiquage des cultures sensibles; sans doute (et cette notion a d'ailleurs été nettement corroborée par des expériences de Bruynoghe), s'agit-il de microbes doués d'une résistance relative, mais qui au cours de leur multiplication sont promptement revenus au type originel réceptif; l'on s'explique ainsi pourquoi, comme on vient de le rappeler, le principe se perpétue indéfiniment au cours des repiquages successifs sur gélose si, au lieu de pratiquer l'isolement, on sème en masse de façon à obtenir un gazon microbien continu; dans ces conditions il se maintient toujours assez de bactéries sensibles pour que le principe puisse se régénérer.

(1) Cela va sans dire; la notion que les principes capables de provoquer des lyses énergiques proviennent d'habitude d'espèces ou de variétés nettement différentes de celles qui se laissent lyser est en parfait accord avec le résultat que Boriet et Ciuca signalèrent en 1921 lorsqu'ils firent connaître les sérums antilytiques, à savoir que si l'on se procure aisément, en injectant à des lapins des suspensions bactériennes lysées, un sérum antilytique capable d'abolir l'activité du principe et d'inhiber sa régénération, on n'obtient pas de sérum neutralisant lorsqu'on injecte les bactéries de même espèce, mais qui n'ont pas été touchées par le principe. Par contre, les recherches de Mac Kinley (*C. R. Soc. de Biol.*, 93, 1925, p. 1050), poursuivies dans notre laboratoire, ont montré, conformément d'ailleurs aux prévisions logiques, qu'en injectant la culture normale du microbe L, lequel est doué d'un pouvoir lysogène spontané, on obtient un sérum qui, ajouté au filtrat de culture de ce microbe, empêche ce filtrat de déclencher la lyse transmissible du bacille de Shiga. Nous devons ajouter toutefois qu'en injectant une autre espèce lysogène (dont il sera question plus loin) nous n'avons pas obtenu de sérum nettement actif. Le résultat dépend sans doute dans une réelle mesure de la quantité de principe que la culture lysogène renferme.

rebelles à la lyse et réfractaires à l'induction, c'est-à-dire inaptes à reproduire le principe (1).

Combien ce résultat diffère de celui qu'on observe à propos du microbe L, lequel ne souffre pas du principe qu'il élabore spontanément. Ici l'isolement, si soigneusement pratiqué qu'il soit, n'élimine pas le pouvoir lysogène, lequel se lègue invariablement de chaque individu microbien à sa descendance. Soit dit en passant, s'il s'agissait d'un virus, on devrait exprimer la discordance de ces résultats en disant que le virus est justement le plus tenace lorsqu'il n'est pas nocif. En pareil cas, les bactéries ne parviennent pas à s'en purger, tandis que, s'il est vraiment pernicieux, elles réussissent à s'immuniser si fortement contre lui qu'elles cessent de l'héberger.

Mais le contraste entre ces deux cas qui semblent diamétralement opposés est-il nécessairement et toujours absolu? Nous avons vu plus haut que la variabilité peut faire surgir, au sein d'une espèce normalement lysogène, tel le microbe L, des types suffisamment distincts pour que les sécrétions de l'un déclenchent la lyse de l'autre. Or, par définition même, la variabilité qui éloigne les uns des autres des types primitivement voisins, doit être susceptible aussi de rapprocher des types primitivement distants. On peut donc concevoir qu'elle fasse apparaître, aux dépens d'une espèce donnée, des types offrant des analogies anormalement prononcées avec les représentants d'une espèce différente, et qui corrélativement soient aptes à se comporter comme des intermédiaires entre ces deux espèces. *A priori* donc, et même lorsque la lyse résulte de l'action, sur une espèce donnée, des sécrétions d'une espèce manifestement différente, il n'est pas impossible qu'au sein de l'espèce induite des types nouveaux surgissent, assez semblables désormais à l'espèce inductrice pour pouvoir, comme elle, manifester le pouvoir lysogène permanent, et pour se montrer, comme elle encore, insensibles à l'influence lytique du principe qu'ils élaborent à leur tour (2).

Mais poursuivons le raisonnement. Ces types intermédiaires

(1) Ces bactéries résistantes, étant exemptes de principe, ne doivent pas permettre, lorsqu'on les injecte au lapin, l'obtention de sérum antilytique. C'est ce que Wollman a démontré (*Ces Annales*, 1927, p. 903).

(2) Un cas de ce genre est signalé dans l'article de ces *Annales*, 1925, p. 753.

nouveaux, assez proches de l'espèce inductrice pour pouvoir en adopter les caractéristiques, ne sauraient, semble-t-il, avoir perdu toute affinité avec l'espèce induite dont ils sont directement issus. En conséquence, n'est-il pas rationnel de prévoir que ces types devenus lysogènes ne lyseront pas l'espèce induite, dont ils dérivent, aussi énergiquement que le fait l'espèce inductrice elle-même ? Nous allons voir que l'expérience confirme ces déductions.

Bien entendu, les exemples de réactions lytiques susceptibles de les démontrer clairement ne sont peut-être pas très nombreux. Fréquemment, comme il a été dit plus haut, l'inventaire des microbes qui ont résisté à la lyse procure aisément des germes inactifs, mais ne fournit pas de cultures douées du pouvoir lysogène et conservant ce caractère à travers les repiquages successifs et les isollements répétés. Nous nous sommes heurtés à ce résultat négatif en opérant notamment sur les principes étudiés depuis longtemps par l'un de nous et qui agissent sur le *B. coli*, ou bien sur un autre principe, actif sur le b. Shiga, provenant d'une eau potable et dont il sera question plus loin, ou bien encore sur un principe retiré d'une urine de pyélonéphrite et qui lysait le bacille coliforme agent de cette maladie (1). Mais en recourant au principe qui se déve-

(1) Ce cas offre quelque intérêt. En ensemençant cette urine pathologique sur gélose, on obtint un gazon microbien continu parsemé de taches de clarification assez nombreuses. C'était à l'état pur le bacille coliforme si fréquent dans les cas de bactériurie. Avec le fil de platine, on préleva des germes pour le repiquage, d'une part au niveau d'une zone clarifiée, et, d'autre part, entre ces plages, à un endroit où la couche microbienne était normale. Des deux cultures obtenues, la première donna par filtration un principe actif sur les microbes fournis par la seconde, celle-ci étant exempte de principe. Mais ces microbes de la seconde culture ne montrèrent, en présence du principe, qu'une lyse passagère. Promptement des germes résistants apparurent, qui, après isolement, ne manifestèrent pas le pouvoir lysogène. Fait assez curieux, l'urine du même malade, prélevée quelques jours plus tard et ensemencée, fournit encore une culture confluyente, mais exempte de principe et résistant parfaitement à celui-ci; on constata d'ailleurs qu'elle n'exerçait aucune influence lytique sur les microbes sensibles que le premier ensemencement de l'urine avait procurés. Fortuitement donc, le premier échantillon de l'urine avait été recueilli au moment précis où le principe apparaissait dans ce liquide et pouvait lyser les microbes, ceux-ci n'ayant pas encore eu le temps d'acquiescer la résistance. Peu après, cette adaptation se réalisa, mais, les germes devenus réfractaires n'étant pas lysogènes, le principe ne put se maintenir. Dans cet exemple donc, le principe fut incapable de produire un effet thérapeutique, et cette constatation inspire quelque doute quant à l'efficacité du traitement des infections vésicales par le bactériophage.

loppe lorsque l'on fait agir le filtrat de la culture du microbe L sur le bacille de Shiga, nous avons pu obtenir, aux dépens de celui-ci, une race conservant avec beaucoup de persistance un pouvoir lysogène marqué vis-à-vis des bacilles normaux de cette même espèce dysentérique. Un tube de bouillon A, additionné de principe L qui a déjà fait quelques passages sur le b. Shiga, estensemencé de b. Shiga. Après une période de lyse bien marquée, des germes résistants viennent troubler le liquide ; au bout de quelques jours, on les ensemence sur gélose. La culture obtenue est soumise à l'isolement par le procédé habituel d'ensemencement, sur une série de tubes de gélose, de suspensions plus ou moins étendues. Un tubeensemencé d'une dilution moyennement étendue fournit des colonies assez nombreuses ; on en repique enbouillon une, que l'on appelle X. Un tubeensemencé d'une dilution extrêmement étendue ne donne qu'une colonie, on la repique en bouillon et la nomme Y. Après quelques jours, on filtre les trois bouillons, c'est-à-dire la culture A aux dépens de laquelle on a effectué l'isolement, les cultures X et Y que celui-ci a fournies. Le filtrat A contient naturellement du principe initial L très actif. Existe-t-il du principe dans les filtrats X et Y ? Dans des tubes de bouillon *a*, *x*, *y* (les tubes contiennent toujours 5 cent. cubes de bouillon et 1 goutte de solution stérile de CaCl_2 à 1 p. 100, nous reviendrons plus loin sur le rôle du calcium) qui ont reçu respectivement XV gouttes des filtrats A, X, Y, on ensemence 1 goutte du b. Shiga normal ; bien entendu, un témoin sans filtrat reçoit du b. Shiga. On observe une lyse énergique en *a*, tandis que *x*, *y* et le témoin se troublent sans se clarifier ultérieurement. Jusqu'à présent donc, il semble que les colonies X et Y ne sont pas lysogènes. Mais on pratique un second passage (tubes *aa*, *xx*, *yy*), en filtrant les liquides *a*, *x*, *y* et les éprouvant sur le b. Shiga comme il vient d'être dit. Etant donné que dans A l'énergique principe initial s'est abondamment régénéré, *aa* montre une lyse prompte et très forte. Mais, d'autre part, l'expérience montre que X contient un principe moins puissant que le principe initial et qui cependant est assez énergétique. Quant à Y, il renferme un principe caractérisé par sa faible puissance, ne provoquant la lyse en *yy* qu'avec un retard très marqué. On observe donc une gradation très nette dans

l'énergie des trois principes; ce résultat se maintient lors des passages ultérieurs. On peut donc conclure que les sécrétions des germes issus des colonies *X* et *Y* ont induit la régénération, par le b. Shiga normal, de principes non identiques au principe *L* initial, celui qui dérive de la colonie *Y* se distinguant le plus nettement par sa faible activité. On démontre d'ailleurs que la faiblesse de ce principe dérivant de *Y* est d'ordre qualitatif et non quantitatif; ce principe, en effet, agit encore à dose extrêmement minime, mais il n'agit, même à forte dose, que faiblement.

Avant de les filtrer pour procéder au troisième passage, ayons soin de repiquer en bouillon les tubes *xx*, *yy* du second passage. Nous cultivons ainsi des germes résistants directement issus, remarquons-le, de bacilles dysentériques normaux impressionnés respectivement par les principes résultant de la réaction, sur le b. Shiga, des sécrétions des colonies *X* et *Y* dont on est parti et qui d'ailleurs étaient également constituées de bacilles de Shiga. Ces germes résistants, soumettons-les ensuite à un isolement très soigneux et repiquons des colonies séparées; nous obtenons ainsi de nouvelles souches que nous appelons *X bis* et *Y bis*. Comment vont-elles se comporter vis-à-vis des trois principes récelés dans les filtrats *aa*, *xx*, *yy*? On trouve que chaque souche est totalement insensible au principe correspondant (ou d'activité inférieure) mais est nettement sensible au principe d'activité supérieure. Ainsi *Y bis* ne se laisse aucunement lyser par le filtrat *yy*, mais se lyse sous l'action du filtrat *xx* ou mieux encore du filtrat *aa*; *X bis* n'est lysable ni par *xx* ni par *yy*, mais subit une lyse tardive sous l'influence de *aa*.

Mais ces nouvelles souches *X bis* et *Y bis* sont-elles lysogènes? Pour répondre à cette question, on éprouve leurs filtrats sur le b. Shiga normal. On trouve que *X bis* n'est plus lysogène. Remarquons à ce propos que *X bis* est apparu sous l'action d'un principe (liquide *x*) qui, sans être aussi fortement lytique que le principe original *L*, était cependant énergique. Or, en cas de principe puissant, on trouve souvent une proportion importante de microbes résistants, mais non lysogènes, ainsi qu'on l'a expliqué au début du présent chapitre. Donc, comme les colonies qu'on repique sont choisies au hasard, on ne doit pas

s'étonner de ce que *X bis* ait été obtenu aux dépens d'une colonie résistante, mais ne produisant plus de principe.

La culture *Y bis* est beaucoup plus intéressante. Sans jamais manifester aucun indice de lyse spontanée, elle se montre lysogène, elle continue à sécréter le principe décelé dans le liquide *y*, et qui se distingue si nettement du principe L originel. Bien plus, soumis à une série d'isolements successifs (1), ce type microbien garde imperturbablement le pouvoir lysogène spécial qui le caractérise, il s'est stabilisé. Chose remarquable, tandis qu'il se montre parfaitement réfractaire au principe qu'il sécrète lui-même et qui agit lytiquement sur le b. Shiga normal, ce type *Y bis* manifeste, à titre permanent, une sensibilité prononcée vis-à-vis du principe originel L. Il s'est équilibré à son propre principe, sans s'élever au niveau d'un principe d'activité supérieure. Il représente une variété autonome et distincte qui doit ses qualités à ce que, vraisemblablement reliée au microbe L par des affinités spécialement prononcées, elle a laissé s'intégrer dans sa physiologie le pouvoir lysogène de cette espèce, tout en le modifiant cependant en fonction de sa propre nature et de ses potentialités propres. En résumé donc, le principe du microbe L, agissant sur le bacille de Shiga, a fait apparaître par induction une race nouvelle et stable de b. Shiga, inductrice à son tour vis-à-vis du b. Shiga normal, mais dont le principe, actif sur celui-ci, se distingue nettement du principe originel L en ce qu'il est moins énergique (2); c'est vraiment un principe nouveau, bien que naturellement il soit apparenté, par sa filiation même, au principe L.

En somme, nous possédons désormais deux cultures de b. Shiga : la culture primitive dite normale, la culture *Y bis* qui impressionne lytiquement la première. A vrai dire, *Y bis* a été obtenu par un artifice de laboratoire, la mise en jeu du

(1) Pour des raisons sur lesquelles nous reviendrons plus loin, on utilise pour les dernières opérations d'isolement des milieux nutritifs oxalatés. Nous verrons que le pouvoir lysogène de *Y bis* persiste dans les cultures en milieux décalcifiés, bien que le calcium soit nécessaire à l'effet lytique de ce principe *Y bis* sur le b. Shiga normal et à sa régénération par celui-ci.

(2) Si l'on fait agir le principe *Y bis* sur le b. Shiga normal, on obtient des germes qui résistent fort bien à ce principe, mais sont lysables par le principe L, tandis qu'en présence du principe L le b. Shiga normal fournit des résistants qui tolèrent le principe *Y bis* comme le principe L.

principe L. Mais comme les interréactions entre espèces microbiennes doivent fréquemment se produire dans les conditions naturelles, notamment dans le contenu intestinal, rien n'interdit d'imaginer qu'on puisse trouver fortuitement certaines souches de b. Shiga capables de lyser visiblement d'autres souches de même espèce. Bien plus, qui sait si, d'une seule et même souche de b. Shiga, on ne pourrait pas retirer parfois des germes investis des potentialités voulues pour être, à un moment donné, capables de réagir sur certains de leurs congénères comme *Y bis* réagit sur le b. Shiga normal? N'est-ce pas précisément ce que l'un de nous a constaté à propos de la culture pure du microbe L, dont on a pu, par simple isolement, sans intervention quelconque de principe étranger, extraire des germes qui, cultivés séparément dans la suite, se sont révélés aptes à attaquer d'autres individus de même espèce?

Ici nous voyons poindre, à propos du microbe L, une objection, ou plutôt une remarque. Nous avons considéré jusqu'ici que le pouvoir lysogène du microbe L lui appartient en propre, en d'autres termes, qu'il y est autochtone. Ne pourrait-on prétendre que ce microbe L n'est pas spontanément lysogène et que cette propriété lui a été communiquée autrefois, lorsqu'il vivait dans les milieux naturels, par le contact fortuit avec une autre espèce lysogène, exactement comme le pouvoir lysogène du Shiga *Y bis* est dû à l'influence du microbe L lui-même? Il est bien évident que, *a priori*, on ne saurait exclure cette possibilité; peut-être une espèce inductrice qui nous reste inconnue a-t-elle, à un moment donné, conféré au microbe L sa propre qualité lysogène. Seulement, si en réalité cette espèce inductrice existait, la même hypothèse se reproduirait pour ce qui la concerne, on pourrait imaginer qu'elle aussi doit son activité à l'influence d'une espèce étrangère. Et ainsi de suite indéfiniment, de sorte que le problème serait incessamment reculé sans être jamais résolu. Il y a de quoi être perplexe, et nous éprouverons cette même impression lorsque nous envisagerons le principe antistaphylococcique, lequel prête à des considérations analogues. Il faut cependant bien, en dernière analyse, accepter l'existence d'espèces possédant primitivement et spontanément le pouvoir d'engendrer des principes lytiques, et comme les limites entre espèces sont souvent indécises, et

comme des propriétés analogues se retrouvent souvent chez des microbes divers, il semble rationnel de penser que, loin d'être exceptionnel, le pouvoir lysogène spontané doit être communément répandu. D'ailleurs, s'il était vraiment rare, comment tant de microbes variés trouveraient-ils dans leur physiologie les ressources voulues pour manifester le pouvoir lysogène induit dès qu'un principe approprié les touche? Au surplus, il convient de revenir à ce propos sur une réflexion déjà formulée. Quand on dit que telle colonie ou culture n'a pas montré de pouvoir lysogène, cela signifie simplement que le germe employé comme détecteur n'a rien pu déceler. Cette réserve s'impose, et ce correctif s'applique bien entendu à l'ensemble des résultats énumérés dans les pages précédentes, de nombreuses transitions reliant sans doute les microbes lysogènes à ceux qui ne semblent pas l'être ou qui (s'il en existe de tels) ne le sont réellement point. Et si l'on songe aux multiples réactions qui, dans la Nature s'effectuent inévitablement entre espèces différentes ou variétés de même espèce, on aboutit à cette conclusion que dans la Nature le phénomène lytique doit se présenter sous des modalités innombrables, étant intimement lié au phénomène de variabilité dont il est à la fois la conséquence et l'un des déterminants.

Le rôle des sels calciques.

Stassano et de Beaufort (1) ont signalé qu'un principe étudié par eux ne lyse pas en présence de citrate de soude et que l'influence empêchante de ce produit est neutralisée par les sels solubles de calcium. L'un de nous (2) a reconnu que le principe dont il a été souvent question plus haut, et qu'on obtient en faisant agir les sécrétions du microbe de Lisbonne sur le bacille de Shiga, exige formellement la présence de sels calciques. Introduit dans du bouillon oxalaté à 1 p. 1.000 qu'on ensemence ensuite de bacille de Shiga, il n'exerce aucune action sur le développement microbien et corrélativement ne se régénère pas. Même lorsqu'on n'ajoute pas d'oxalate, il

(1) *C. R. Soc. de Biol.*, 93, 1925, p. 4380.

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, 94, 1926, p. 403.

suffit que le bouillon soit fortement alcalinisé, c'est-à-dire soit pauvre en sels calciques, pour que la lyse fasse défaut; en pareil cas l'addition d'un peu de chlorure calcique au bouillon la fait apparaître; le chlorure de strontium produit le même effet. Par contre, il est d'autres principes qui agissent fort bien en bouillon oxalaté. Cette discordance n'est probablement qu'apparente, on sait que l'oxalate de soude n'insolubilise pas la totalité du calcium, il est vraisemblable qu'une trace de ce métal est toujours nécessaire, mais que les divers principes se distinguent en ce qu'ils en exigent des quantités différentes pour entrer en action et pour se reproduire. Ce qui nous porte à le croire, c'est que nous possédons un principe dont les effets lytiques sont considérablement retardés, sans être supprimés, lorsqu'on le fait agir en bouillon oxalaté à 1 p. 1.000; il a donc besoin de calcium, mais n'en réclame que très peu. Ces constatations concernant le rôle du calcium nous ont conduits à ajouter systématiquement un peu de chlorure calcique aux bouillons servant aux expériences de lyse (1). Cette règle a été observée pour tous les essais, datant de moins de trois ans environ, qui se trouvent cités dans le présent mémoire.

Nous venons de signaler que le principe L obtenu par action du filtrat de culture du microbe L sur le bacille de Shiga est inactif en bouillon oxalaté. Dans ces conditions, ce bacille reste intact et le principe ne se régénère aucunement. Au contraire, en présence d'un peu de chlorure calcique, la lyse est intense et la concentration du principe s'élève considérablement. On peut, dans ces conditions, rechercher si, étant donné un bouillon contenant, outre le chlorure calcique, une dose assez forte de principe L, et qui, grâce à celui-ci, est resté bien limpide un certain nombre d'heures après avoir étéensemencé de bacille de Shiga, la précipitation du calcium provoquée à ce moment par addition d'oxalate permettra le développement microbien. L'expérience répond affirmative-

(1) On ajoute une goutte de CaCl_2 à 1 p. 100 stérile dans chaque tube contenant 5 cent. cubes de bouillon. On ne pourrait ajouter ce sel avant la répartition du bouillon en tubes et la stérilisation, car la réaction alcaline à chaud le précipiterait. Il convient d'ailleurs que la réaction alcaline ne soit pas exagérée, car en pareil cas le léger trouble qui apparaît au moment où la goutte de CaCl_2 est introduite, au lieu de disparaître promptement par agitation, se condense en flocons.

ment. Même lorsque l'oxalate est ajouté très tardivement, dix ou quinze heures par exemple après l'ensemencement, une abondante multiplication du bacille s'effectue promptement, tandis qu'elle continue à faire défaut dans le témoin qui ne reçoit pas d'oxalate. L'intervention obligatoire et très directe du sel calcique dans le processus lytique est ainsi mise en évidence.

On peut, d'autre part, dans un bouillon contenant le principe L mais exempt de calcium, et qu'on ensemence de bacille de Shiga, introduire ultérieurement le chlorure; naturellement le développement du microbe s'effectue dès les premières heures, mais, s'il n'est pas encore très abondant, par exemple quatre heures d'étuve après l'ensemencement, l'intervention du sel calcique fait encore apparaître la lyse, tardivement à vrai dire.

Puisque l'addition d'oxalate, en supprimant l'action du principe L sur le bacille de Shiga, empêche sa régénération, il est intéressant de rechercher l'effet de la décalcification non plus sur le bacille de Shiga additionné de principe L, mais sur le microbe L lui-même. Après de fréquents passages sur des milieux nutritifs additionnés d'une forte dose d'oxalate, ce microbe manifestera-t-il encore le pouvoir de déclencher la lyse transmissible du bacille de Shiga?

L'expérience répond affirmativement. A la suite de nombreux passages sur bouillon oxalaté et même après avoir été finalement isolé sur gélose oxalatée à 1 p. 100, le microbe L n'a pas perdu son pouvoir lysogène spontané. Si on le cultive d'une part en bouillon oxalaté, d'autre part en bouillon calcifié, et filtre ensuite les liquides, on constate que ces deux filtrats peuvent, en bouillon calcifié, déclencher la lyse du bacille de Shiga. A vrai dire, lors du premier passage sur le bacille Shiga, le filtrat de la culture oxalatée est très nettement moins actif que celui de la culture calcifiée, mais, dès le second passage, la différence disparaît. Au surplus, lorsque le microbe L longtemps entretenu en oxalate est repiqué en bouillon calcifié, il se comporte comme s'il n'avait jamais été privé de sels calciques, c'est-à-dire reprend immédiatement son intense pouvoir lysogène habituel. Si le principe était un virus, on ne comprendrait guère comment il parvient à se maintenir chez le

microbe L en milieu oxalaté, tandis qu'il se refuse en milieu oxalaté à attaquer le bacille Shiga. En réalité, l'aptitude à produire ce principe est inscrite dans la trame du microbe L, elle est inhérente à sa physiologie sans l'être à celle du bacille Shiga. Aussi le microbe L la garde-t-il même en l'absence de sels calciques. Ce qui exige beaucoup plus impérieusement la présence de ces sels, c'est la régénération du principe par induction, c'est-à-dire grâce à l'intervention d'une autre espèce, le bacille de Shiga.

Nous avons reproduit ces expériences en les faisant porter sur le bacille Shiga lysogène Y *bis* dont il a été question dans les pages précédentes. Les résultats ont parfaitement concordé avec ceux que nous venons de consigner concernant le microbe L. Comme il a été dit plus haut, après de nombreux passages en bouillon oxalaté et isolement sur gélose oxalatée, Y *bis* est resté lysogène. Il suffit alors de l'ensemencer en bouillon calcifié pour obtenir un principe actif sur le bacille de Shiga normal, lequel pourtant ne le régénère qu'en présence de calcium. Par exemple, si on introduit une ou plusieurs gouttes de ce principe dans un tube de bouillon oxalaté qu'on ensemence de bacilles Shiga, on n'observe ni lyse ni élévation de la concentration du principe, tandis que la régénération s'opère très activement si l'on opère sur du bouillon calcifié qui a reçu, de ce même principe, soit les mêmes doses, soit une quantité considérablement moindre, telle que 1/10.000 de goutte.

Inventaire bactériophagique d'une eau potable.

Nous avons éprouvé, sur deux espèces microbiennes, le bacille de Shiga et un bacille coli qui nous sert depuis longtemps pour les recherches sur la lyse transmissible, l'eau de distribution de la Compagnie intercommunale des Eaux, qui dessert une bonne partie de l'agglomération bruxelloise.

Nous employons régulièrement du bouillon bleuisant de façon perceptible le papier de tournesol, et que l'on distribue en tubes de 5 cent. cubes. Après stérilisation, chaque tube reçoit une goutte de solution stérilisée de chlorure calcique.

à 1 p. 100; nous venons de rappeler le rôle important de ce sel dans l'autolyse transmissible.

Si dans un tel tube de bouillon qu'on vient d'ensemencer de bacille coli, on introduit XX gouttes d'eau de la distribution, filtrée au préalable sur bougie Chamberland, on ne constate pas de lyse précoce. Après dix ou douze heures de séjour à l'étuve, le bouillon est aussi trouble qu'un tube témoin identique sauf qu'on n'y a pas ajouté d'eau. Mais il se clarifie peu à peu dans la suite, après trois ou quatre jours il est presque limpide. On le filtre à ce moment et on ajoute quelques gouttes de filtrat à un bouillon qu'onensemence de bacille coli. Cette fois, la limpidité du liquide se maintient pendant de nombreuses heures; ultérieurement, un trouble plus ou moins prononcé apparaît grâce au développement de microbes résistants, mais, dans la suite, ceux-ci à leur tour subissent, au moins partiellement, le processus lytique, de sorte que finalement le bouillon reste très clarifié. Des passages ultérieurs exaltent l'énergie de ce principe actif sur le bacille coli.

Lorsqu'on réalise la même expérience en employant, au lieu du bacille coli, le bacille de Shiga, on n'obtient pas de lyse perceptible. Mais il en va tout autrement si l'on met en jeu, non point l'eau simplement filtrée, mais le filtrat d'une culture obtenue en maintenant trois ou quatre jours à l'étuve de l'eau non filtrée mélangée à volume égal de bouillon. Ensemencé dans du bouillon calcifié additionné de XX gouttes de ce filtrat, le bacille de Shiga se développe normalement pendant les sept ou huit premières heures, mais à ce moment le trouble intense qui s'est produit se clarifie et bientôt le liquide est limpide. Le lendemain, des germes résistants apparaissent et le bouillon se retrouble. Des passages sur le bacille de Shiga rendent le principe plus actif. Fait intéressant, le principe anti-Shiga ainsi obtenu n'exerce aucune influence sur le bacille coli, et, *vice versa*, le principe qui vient d'être mentionné et qui agit sur le bacille coli n'agit pas sur le bacille Shiga. Il fallait évidemment tenter de découvrir les microbes à qui l'eau doit son pouvoir de déclencher la lyse transmissible des bacilles coli et Shiga. Disons immédiatement que nous n'avons pas réussi à identifier la bactérie productrice du principe sur le bacille coli. Elle ne paraît pas se maintenir en bouillon (sans

doute en raison de la concurrence des autres microbes), car, si l'on repique à plusieurs reprises sur ce milieu la culture primitivement obtenue par mélange d'eau et de bouillon, le principe anti-Coli cesse bientôt d'être décelable.

Nous avons été plus heureux pour ce qui concerne le microbe responsable du principe actif sur le bacille de Shiga. Soumise à la technique ordinaire de l'isolement sur gélose, la culture originelle d'eau additionnée de bouillon fournit une série d'espèces microbiennes qui, soigneusement purifiées, sont cultivées en bouillon calcifié. On filtre ces cultures sur bougie et on éprouve les filtrats en introduisant XX gouttes dans des bouillons calcifiés ensemencés de bacille de Shiga. L'un de ces filtrats provoque une lyse tout à fait analogue à celle que déclenche le filtrat de la culture originelle, c'est à-dire s'effectuant déjà très activement dès le premier passage. Le microbe lysogène est donc identifié (microbe A). Des essais similaires permettent de démontrer que l'eau contient encore un autre microbe (B) lysogène pour le bacille de Shiga. Mais ce second microbe est moins actif, il faut deux ou trois passages sur le bacille de Shiga pour que son filtrat provoque une lyse bien perceptible, laquelle, à la faveur de passages ultérieurs, devient très énergique.

Les cultures de ces deux microbes A et B sont très florissantes et l'on n'y dénote aucun indice de lyse. Lorsqu'on ensemence sur gélose des suspensions très étendues, on obtient des colonies bien éloignées les unes des autres, d'aspect parfaitement normal et qui, repiquées sur bouillon, donnent des cultures dont le filtrat est actif. Il s'agit donc de bactéries douées, comme le microbe de Lisbonne, d'un pouvoir lysogène spontané qui leur est inhérent. Ce sont des Coliformes, leur morphologie est sinon tout à fait identique, au moins fort semblable; A est très mobile tandis que B l'est fort peu. Ils sont Gram-négatifs, produisent beaucoup d'indol, fermentent le glucose et le lactose mais non le saccharose. B fermentent l'adonite, tandis que A ne possède pas cette propriété.

Nous avons injecté à des lapins le microbe A. Bien qu'il soit lysogène, nous n'avons pas obtenu de sérum antilytique. Par contre, on obtient facilement, en injectant au lapin du bacille coli lysé par le principe correspondant signalé plus haut,

un sérum qui neutralise énergiquement ce principe. Nous employons depuis très longtemps un autre principe, actif également sur le même bacille coli et qui, de plus, lyse aussi le b. Shiga. Or, le sérum en question ne le neutralise pas. Il ne neutralise pas davantage les principes antidysentériques ci-dessus mentionnés et qui proviennent des microbes A et B.

En résumé, bien que nous n'ayons pu réaliser l'isolement de tous les microbes générateurs des principes révélés, ces recherches plaident nettement en faveur de l'origine bactérienne des bactériophages qu'on rencontre dans les milieux naturels. Elles montrent aussi qu'un même milieu peut renfermer des principes qui diffèrent tant sérologiquement que par la nature des espèces qu'ils attaquent. Encore faut-il largement tenir compte de ce que de tels essais sont manifestement fort incomplets. En effet, nous n'avons employé, comme microbes révélateurs de principes, que deux espèces, les bacilles coli et de Shiga. Il est bien vraisemblable que d'autres microbes se prêteraient également à ce rôle détecteur et permettraient de découvrir d'autres principes encore, nombreux peut-être, chacun d'eux émanant d'une espèce particulière. Sans doute réussira-t-on quelque jour à constituer toute une collection de microbes spontanément lysogènes auxquels correspondront des espèces réceptives aptes à déceler chaque principe.

Les microbes A et B dont il vient d'être question, le microbe L découvert par Lisbonne et Carrère, possèdent en commun la qualité d'être lysogènes à l'égard du bacille de Shiga, de sorte que nous pouvons obtenir trois principes. Chacun d'eux peut être considéré comme étant unique et bien pur puisque chacun d'eux émane d'une espèce bactérienne déterminée. Dans ces conditions, il est intéressant de les confronter en recherchant si ces principes, ayant chacun leur individualité bien définie et qui s'adressent tous au bacille de Shiga, portent en réalité leur action, au sein de cette espèce dysentérique, sur le même type microbien. Nous avons opéré sur les principes engendrés par les microbes A et L.

Lorsqu'on ensemence de b. Shiga des tubes de bouillon contenant respectivement ces deux principes, la lyse qui s'observe est suivie de l'apparition de microbes résistants, lesquels, repiqués en bouillon, donnent bientôt des cultures prospères.

Dès lors, la question se pose de savoir si les germes obtenus en présence du principe A, et qui désormais le tolèrent, sont encore lysables par le principe L, et si, réciproquement, les germes devenus rebelles au principe L sont encore sensibles au principe A. Or, l'expérience montre que la résistance est spécifique. Les microbes réfractaires à L manifestent à l'égard de A une réceptivité semblable à celle du b. Shiga normal; *vice versa*, la résistance à A n'implique pas la résistance à L. Or, si les types microbiens respectivement insensibles aux principes A et L ne sont pas identiques, nous avons le droit d'inférer que, symétriquement, les types microbiens lysables par ces principes ne se confondent pas davantage (1). Ces résultats viennent donc corroborer ce que nous exprimions plus haut, à savoir qu'à la mosaïque des principes correspond, au sein de l'espèce bactérienne, une mosaïque des types microbiens, et que cette donnée permet d'interpréter aisément le fait de l'accroissement d'activité des principes sous l'influence des passages. Peut-on, dans ces conditions, se rallier à la théorie du virus? Si elle était vraie, il faudrait accepter que les virus existant symbiotiquement chez les bactéries A et L sont différents, et le sont à tel point qu'ils attaquent, chez la même espèce, bacille dysentérique, des types microbiens différents. Tandis que si les principes sont des produits bactériens, il n'est pas surprenant qu'ils soient distincts lorsqu'ils émanent des espèces différentes A et L.

L'origine du principe staphylococcique de la lymphe vaccinale.

On sait que le premier exemple de lyse transmissible est dû à Twort. En 1915, ayantensemencé sur gélose de la lymphe vaccinale glycinée, cet auteur avait obtenu des colonies isolées de staphylocoque blanc qui toutes paraissaient normales au début, mais dont plusieurs subissaient dans la suite une

(1) Nous avons étudié plus haut, pour ce qui concerne le comportement des résistants, les principes L et Y *bis*. Ajoutons ici que les b. Shiga devenus résistants au principe Y *bis* sont encore lysables par le principe A et réciproquement.

curieuse modification. Elles prenaient un aspect vitreux et transparent qui témoignait d'un processus lytique; à ce moment, l'examen microscopique ne décelait plus que des débris microbiens. Ce phénomène de lyse semblait offrir un caractère contagieux, car il suffisait, pour que des colonies d'aspect normal subissent la même altération, de déposer à leur surface une trace de colonie lysée. Toutefois les cultures tuées ne se laissaient pas modifier; l'agent modificateur ne se multipliait que sur les microbes vivants. Le filtrat de délayage de colonie lysée, ajouté à une suspension en bouillon du staphylocoque provenant de la lymphe vaccinale, y provoquait une lyse énergique. Si on filtrait ensuite cette suspension, on obtenait un liquide investi de la même propriété, le phénomène lytique était régulièrement transmissible.

Entre ce phénomène et celui qu'ultérieurement d'Hérelle signala à propos du bacille dysentérique, l'analogie est absolue, ainsi que Gratia, puis Gratia et Jaumain parent le démontrer en 1921-1922. Ces auteurs constatèrent de plus que le principe approprié au staphylocoque n'agit pas sur le bacille dysentérique, et qu'un principe impressionnant le bacille dysentérique n'exerce pas d'influence sur le staphylocoque. Ils reconnurent en outre que ces principes divers se distinguent par leur spécificité antigénique; ils ne sont neutralisables que par les sérums correspondants qu'on obtient par injection de suspensions lysées.

Ne peut-on supposer que le principe contenu dans la lymphe vaccinale est d'origine bactérienne? Nous étant proposé de rechercher dans la lymphe le microbe responsable de l'apparition de ce principe actif sur le staphylocoque, nous avons soumis la lymphe à la technique de l'isolement sur gélose (1). Nous avons récolté ainsi six espèces bactériennes, c'est-à-dire trois bacilles, deux microcoques et un staphylocoque blanc, et avons tout d'abord éprouvé la sensibilité de ces divers microbes

(1) Il est superflu d'insister sur la nécessité de bien débarrasser les microbes du liquide où ils baignaient, c'est-à-dire d'effectuer l'isolement avec grand soin. On doit exiger que, sur le milieu solide, les colonies soient fort éloignées les unes des autres. De plus, il faut les soumettre à un réisolement. On délaie chaque colonie dans quelques centimètres cubes de bouillon et pratique le nouvel isolement aux dépens de cette suspension. Nous avons régulièrement observé cette technique.

vis-à-vis du principe. Celui-ci s'obtient très aisément : il suffit de filtrer, soit de la lymphe qu'on vient de délayer dans du bouillon, soit une culture, âgée de quelques jours, de lymphe ensemencée dans du bouillon. Or, si dans des tubes contenant 5 cent. cubes de bouillon, 1 goutte de chlorure calcique à 1 p. 100 et XX gouttes du filtrat, on ensemence respectivement les six bactéries mentionnées, on constate que seul le staphylocoque blanc se montre sensible : il subit une lyse prompte et complète, tandis que la culture témoin qui n'a pas reçu de filtrat se trouble fortement sans jamais subir de clarification. On accroît encore l'énergie du principe par le procédé habituel des passages; la lyse est indéfiniment transmissible.

Donc, nous possédons désormais un microbe sensible, c'est-à-dire le réactif voulu pour déceler la présence du principe. Reste à déterminer la bactérie qui produit celui-ci.

Disons tout de suite que les trois bacilles et les deux microcoques peuvent être mis hors de cause; le filtrat de leur culture en bouillon calcifié ne déclenche aucunement la lyse du staphylocoque blanc.

Dans ces conditions, le pouvoir lysogène n'appartiendrait-il pas au staphylocoque lui-même? Nous venons de signaler que ce staphylocoque est sensible au principe, n'est-il point paradoxal de présumer qu'il pourrait être lysogène tout en étant réceptif? On va voir cependant que l'hypothèse se confirme, et l'on comprendra dans la suite que la coexistence dans une même culture du pouvoir lysogène et de la réceptivité n'est pas réellement surprenante.

COLONIE AGRESSIVE ET COLONIE RÉCEPTIVE. — Ensemencé en bouillon, le staphylocoque blanc donne une culture prospère n'offrant rien d'anormal. Après quelques repiquages dans ce milieu, pratiquons l'isolement sur gélose. Des colonies bien séparées apparaissent. On en choisit deux qui ne se distinguent que par de menus détails d'aspect; l'une étant parfaitement arrondie tandis que les bords de l'autre sont légèrement sinueux. Repiquées en bouillon, ces deux colonies donnent des cultures quelque peu différentes au début; l'une que nous appellerons A montrait un peu de floconnement, tandis que

l'autre (R) présentait un trouble homogène; dans la suite ces différences s'atténuèrent beaucoup.

Après trois ou quatre jours d'étuve, filtrons les deux cultures en bouillon, et recherchons si le filtrat de l'un de ces microbes n'exerce pas d'influence sur le développement de l'autre. On constate que l'introduction de XX gouttes du filtrat R dans un tube de bouillon calcifié, qu'on ensemence ensuite de microbe A, ne produit aucun effet perceptible sur le développement; des passages successifs restent sans résultat. Mais il n'en va pas de même si l'on procède à l'essai inverse. En présence du filtrat de A, la culture du microbe R est nettement moins trouble que celle d'un témoin R non additionné de filtrat; une clarification partielle s'effectue. Si après trois jours on filtre cette culture incomplètement lysée et introduit du filtrat dans un nouveau tube de bouillon ensemencé de R, on observe une lyse rapide et complète qui devient plus manifeste encore lors des passages ultérieurs.

L'expérience montre donc que R n'attaque pas A, mais que A déclenche la lyse de R. Le type microbien A est agressif, c'est-à-dire capable de jouer le rôle d'inducteur, le type R étant réceptif, c'est-à-dire susceptible d'être induit. Cette propriété que A possède d'être lysogène à l'égard de R ne s'est pas atténuée par la conservation pendant cinq mois sur gélose avec repiquage tous les quinze jours. D'autre part, nous n'avons jamais observé ni chez A ni chez R le moindre indice de lyse spontanée.

Lorsqu'on ensemence R dans du bouillon additionné du principe dérivant de A, on observe, comme il vient d'être dit, une lyse intense, mais bientôt le liquide se trouble en raison de l'apparition de microbes résistants. Si l'on pratique à ce moment l'isolement, repique les colonies séparées, on obtient des cultures filles toutes visiblement résistantes vis-à-vis du principe A, mais dont la résistance est inégale, et dont, chose remarquable, chacune conserve son degré propre de résistance à travers plusieurs repiquages sur gélose. En d'autres termes, on obtient une gamme de résistances, et cette gamme peut être conservée, chacun de ses éléments se maintenant toujours à la place qu'il occupait d'emblée. D'autre part, il est intéressant d'étudier ces divers types de microbes résistants, dont

l'origine est la souche R, au point de vue de leur pouvoir lysogène vis-à-vis précisément de cette souche R initiale. Or, on constate que leurs sécrétions sont capables de déclencher la lyse de celle-ci, c'est-à-dire que, ayant été impressionnés par le principe de la souche A, ils ont acquis, en devenant résistants, les propriétés mêmes de la souche A. Ils se sont en quelque sorte équilibrés, harmonisés à la souche A dont ils ont subi l'influence et, fait digne d'être noté, ce sont, parmi ces types résistants, ceux dont la résistance acquise à l'égard du principe A est la plus prononcée qui manifestent vis-à-vis de R le pouvoir lysogène le plus énergique, en d'autres termes qui présentent avec A la ressemblance la plus étroite. Nous avons signalé, dans la première partie du présent mémoire, le fait que la technique de l'isolement ne fait pas disparaître le pouvoir lysogène induit lorsque le microbe qui le manifeste et le microbe inducteur qui l'a déclenché appartiennent à la même espèce, ou tout au moins se ressemblent suffisamment, et que, de plus, en pareil cas, les germes devenus lysogènes à titre définitif témoignent de qualités lytiques semblables ou du moins comparables à celles des congénères dont ils ont ressenti l'influence inductrice. Le lecteur qui voudra bien se reporter aux considérations exprimées dans les pages précédentes (1) se rendra compte de ce que les résultats ci-dessus consignés leur apportent une frappante confirmation.

Reste à comprendre pourquoi la culture initiale de staphylocoque blanc, mère des souches A et R, se montre lysable par le filtrat de lymphé vaccinale. Ce fait se conçoit aisément pour ce qui concerne l'un des composants de cette culture totale, c'est-à-dire le type réceptif R. Mais pour quelle raison le type agressif A, qui lyse le précédent, se laisse-t-il lui-même lyser par l'extrait de lymphé? Il est infiniment probable (et nous trouverons plus loin la vérification de cette donnée) qu'il existe différents degrés aussi bien dans le pouvoir d'être agressif que dans l'aptitude à être réceptif. Or, la culture initiale, ayant été obtenue grâce à un isolement soigneux, procédait d'un germe unique, l'un des individus staphylococciques qui peuplaient la

(1) Notamment pour ce qui concerne l'influence des diverses races du microbe L les unes sur les autres ou l'apparition, aux dépens du bacille Shiga, du type lysogène Y *bis* sous l'action du principe L.

lymphe vaccinale. Il est fort vraisemblable qu'à côté de celui-là, dont certains descendants ont manifesté le pouvoir agressif, la lymphe en contenait d'autres, nantis de cette même qualité dans une mesure très supérieure encore. En d'autres termes, il est légitime de penser qu'elle renfermait des unités staphylococciques hyperagressives capables de provoquer la lyse de la culture initiale utilisée dans nos expériences.

DISSOCIATION DES SOUCHES A ET R. — En vertu de leur tendance à la variabilité, surtout lorsqu'on les entretient dans les milieux nutritifs liquides où les germes baignant dans leurs excreta réagissent mieux les uns sur les autres, les espèces microbiennes sont sujettes à présenter bientôt une réelle hétérogénéité. Il est à présumer que dans ces conditions une certaine différenciation se produira dans les cultures liquides tant de la souche A que de la souche R, et que par isolement on obtiendra finalement des individus doués à des degrés variables, soit d'agressivité s'ils sont issus de la souche A, soit de réceptivité s'ils descendent de la souche R. Bien plus, il est à supposer qu'au sein même de chaque souche apparaîtront des individus capables de réagir les uns sur les autres grâce au pouvoir lysogène, mais que tous garderont néanmoins dans une réelle mesure l'empreinte de leur hérédité particulière, en ce sens que, par exemple, si certains descendants de R deviennent agressifs vis-à-vis de congénères issus de la même souche R, ils continueront néanmoins à se montrer sensibles au principe de la souche A, comme l'est d'ailleurs la culture R dont ils procèdent.

Considérons d'abord la souche R. Trois fois de suite et à intervalles de huit à dix jours, on la repique en bouillon additionné de chlorure calcique; ensuite, on isole sur gélose et choisit six colonies qu'on ensemence. On recherche la sensibilité de ces cultures filles à l'égard du principe fourni par la souche A. On trouve ainsi que l'une d'elles, que nous appellerons R R a, se lyse avec une remarquable promptitude sous l'action de ce principe. Deux autres ne subissent qu'une lyse, nette à vrai dire, mais cependant assez lente et partielle; les trois autres enfin se montrent particulièrement rebelles; elles donnent lieu à un trouble normal qui, pour ce qui concerne deux d'entre

elles, persiste quatorze et vingt jours avant de s'éclaircir visiblement, et qui, pour la troisième, plus rebelle encore, n'est pas modifié au bout de vingt-cinq jours (1). On voit qu'il existe divers degrés dans la réceptivité. Mais ici se place une constatation susceptible de mieux faire comprendre pourquoi, en général, l'activité des principes s'accroît par les passages. Avant d'éprouver le principe A sur les races spécialement rebelles dont il vient d'être question, portons-le au contact de la race R R α qui au contraire est remarquablement réceptive. Or, après un tel passage, on constate que le principe attaque très facilement les races rebelles. Proche parent de celles-ci, le type R R α a servi en quelque sorte d'intermédiaire grâce auquel le champ d'action du principe a pu s'élargir aisément; ce fait vient confirmer les vues exprimées dans la première partie du présent mémoire, concernant le problème de l'adaptation d'un principe à une espèce déterminée. Plus simple et plus démonstratif encore est l'essai consistant à introduire le principe A dans du bouillonensemencé à la fois d'une des races rebelles et de la race R R α très réceptive. Dans ces conditions la lyse est rapide et complète, tandis qu'elle eût été très pénible ou même imperceptible si la race rebelle avait été ensemencée seule. Apte à se laisser aisément induire en devenant lysogène à son tour, la race réceptive régénère un principe qui convient spécialement à la lyse de la race rebelle, pour la raison que ces deux races, dérivant toutes deux de la souche R, sont très étroitement apparentées. On peut même obtenir une lyse moins prompte mais cependant très nette encore en ensemencant la race R R α quelques heures après la race rebelle, c'est-à-dire au moment où le développement de celle-ci est déjà très appréciable.

D'autre part, il convient de rechercher si les six cultures dérivées de la souche R s'impressionnent mutuellement. Or, on constate en effet que certaines d'entre elles manifestent vis-à-vis de leurs congénères un pouvoir agressif net (2). Toutefois,

(1) Bien entendu, si, filtrant ensuite ces cultures où la lyse s'effectue si péniblement, on procède à des passages sur les mêmes races, la lyse apparaît bientôt beaucoup plus promptement, l'activité des principes sur ces variétés s'exaltant.

(2) La plus active est la culture R R α , qui manifeste même un pouvoir agressif vis-à-vis de la souche totale R dont elle est issue. Or, cette culture

jusqu'à présent, elles ne nous ont pas fourni de filtrats dont l'activité égalât celle du filtrat de la souche A.

L'étude de la souche A conduit à la même conclusion, à savoir qu'au sein d'une culture apparaissent bientôt des individus microbiens dont les propriétés ne sont pas absolument identiques. Une culture de A sur gélose subit, à onze jours d'intervalle, deux repiquages en bouillon; après six jours d'étuve, cette dernière culture est soumise à l'isolement, on recueille quatre colonies, d'ailleurs tout à fait pareilles, aux dépens desquelles on répète l'isolement. On obtient ainsi finalement quatre souches filles, lesquelles, cultivées en bouillon, donnent des filtrats qui tous sont actifs vis-à-vis de la souche R mais le sont à des degrés quelque peu différents; ces différences sont assez stables. De plus, on trouve que ces diverses cultures filles de A peuvent présenter un certain degré d'agressivité l'une pour l'autre (1). A vrai dire, il s'agit de lyses partielles mais qui cependant s'accroissent manifestement grâce à des passages successifs.

En résumé, les descendants de nos deux souches primitives A et R gardent, dans une mesure bien appréciable, trace de leurs qualités ancestrales, tout en attestant une tendance évidente à la variabilité. Les descendants de R sont réceptifs mais le sont inégalement, les descendants de A sont agressifs sans l'être au même degré. En outre, au sein de chaque descendance, c'est-à-dire entre les germes qui sont le plus étroitement apparentés, des antagonismes s'exprimant par le pouvoir lysogène ont clairement apparu. Mais les divers staphylocoques obtenus gardent à travers les repiquages successifs, tout au moins s'ils sont entretenus sur gélose, les caractères distinctifs qu'on leur reconnaissait au début; la variabilité se trahit plus clairement dans les cultures en bouillon.

R R *a* est également, comme il vient d'être dit, la plus sensible au principe A, et il est curieux de constater la coexistence de ces deux propriétés apparemment contraires, agressivité et réceptivité, quoique, au surplus, on ne soit pas forcé d'admettre une incompatibilité absolue entre la qualité d'être réceptive à l'égard du principe provenant d'une souche déterminée et l'aptitude à lyser une autre culture.

(1) Inutile de faire remarquer que ces résultats relatifs à la souche A concordent entièrement avec ceux que nous avons rappelés plus haut concernant l'espèce L, où les divers individus microbiens peuvent se distinguer par l'inégalité de leur pouvoir lytique vis-à-vis du b. Shiga, ou bien encore par le fait que certains d'entre eux peuvent lyser d'autres germes de même espèce.

RÔLE DU CALCIUM. — Le principe que la souche A a fourni en réagissant sur la souche R, introduit en bouillon calcifié qu'on ensemence de la souche R, provoque la lyse et corrélativement se régénère fort activement. Par contre, dans une telle expérience, la lyse et la régénération font défaut si le bouillon, au lieu d'avoir reçu du chlorure calcique, a été oxalaté à 4 p. 1.000. Mais, chose remarquable, si on cultive en bouillon oxalaté la souche A elle-même, on trouve qu'en dépit de l'absence de calcium cette souche produit l'agent capable de déclencher ensuite, en milieu calcifié, la lyse de la souche R. Les phénomènes sont en somme fort semblables à ceux que nous avons signalés plus haut concernant le microbe L. Il semble dans ces conditions que la production initiale de l'agent lytique par la souche A exige moins de calcium que la régénération, corrélatrice de la lyse, du principe par la souche R, et dès lors on peut se demander si le principe se trouve exactement dans le même état à ces deux moments différents, en d'autres termes, si le principe originellement sécrété par la souche A (laquelle est, si l'on peut dire, « déclenchatrice ») ne se distingue aucunement du principe secondairement reproduit par la souche lysable R (laquelle est « déclenchée »). C'est un point assurément délicat à trancher. Il nous a paru que les propriétés du principe, tel qu'il est élaboré par A, d'une part, tel qu'il est régénéré par R d'autre part, ne sont pas tout à fait identiques. Notamment, le principe sécrété par A semble beaucoup moins résistant à la conservation; de plus, il se comporte comme s'il ne possédait qu'à un degré beaucoup plus faible la qualité antigénique. Nous n'avons pas réussi à obtenir chez le lapin un sérum antilytique par injection de filtrat de la souche A, tandis que l'injection du principe produit par R, lysée sous l'action des sécrétions de A, procure facilement un sérum neutralisant. Nous ne saurions nous prononcer nettement; des recherches plus complètes seraient nécessaires.

En résumé, l'étude de la lymphé vaccinale et des staphylocoques qu'elle contient nous paraît démontrer clairement que le principe est d'origine bactérienne (4) et qu'il se comporte

(4) Le principe est-il autochtone chez le staphylocoque, ou bien celui-ci a-t-il conservé l'impression qu'une autre espèce, fonctionnant comme inductrice, lui a communiquée? Nous nous sommes posé la même question plus

comme étant à la fois l'indice et l'instrument des interractions entre les individus microbiens que la tendance à la variation a investis de qualités sensiblement différentes. Si l'on adoptait la théorie du virus, on devrait accepter que celui-ci est susceptible, pour ce qui concerne l'énergie de son pouvoir nocif, d'affecter des modalités multiples et diverses, et qu'en dépit de la possibilité d'accroissement de la virulence, un état d'équilibre symbiotique entre le parasite et son hôte parvient toujours à s'établir et à se perpétuer, en sorte que l'on peut régulièrement observer des races qui, tout en restant indemnes, véhiculent un virus dangereux pour d'autres variétés. Peut-être allèguera-t-on qu'un tel état de choses se rencontre chez les animaux; il est avéré, en effet, que des organismes infectés, dénommés porteurs de germes, peuvent rester bien portants. Mais il s'agit alors d'êtres supérieurs qui, étant composés de tissus variés et d'une infinité de cellules, peuvent être atteints d'un parasitisme trop strictement localisé pour leur être préjudiciable. Des êtres monocellulaires, telles des bactéries, pourraient-ils se comporter semblablement? Il serait téméraire de l'admettre.

Le fait que la lymphe vaccinale est un exsudat riche en cellules et sans doute en substances capables d'agir sur les microbes, doit-il retenir l'attention lorsqu'on songe au déterminisme de ces variations microbiennes qui font surgir des races susceptibles de réagir les unes sur les autres? Que l'intervention des sucs organiques soit réellement obligatoire, ce ne semble guère probable, puisque des bactéries provenant du sol ou de l'eau, tel le microbe L, permettent des constatations tout à fait superposables à celles dont il a été question ci-dessus à propos du staphylocoque extrait de la vaccine. Mais, conformément à une interprétation déjà émise plus haut, il est possible que les influences modificatrices ou sélectives exercées par des agents tels que les phagocytes favorisent la tendance des microbes à la variation et conséquemment l'apparition de types doués, à un degré inusité, soit du pouvoir agressif, soit de la qualité réceptive. Il est évidemment difficile d'apporter,

haut, à propos du microbe L, sans pouvoir, bien entendu, y répondre. En somme, si la seconde hypothèse était la vraie, le résultat resterait le même, sauf qu'il serait déplacé.

à ce propos, des preuves irréfragables. Au surplus, cette question n'offre plus un intérêt aussi fondamental depuis que, par d'autres voies, l'origine bactérienne des principes et leur signification biologique semblent clairement s'avérer.

*
* *

Nous laissons au lecteur le soin de conclure et de choisir entre les deux théories. Remarquons cependant que parfois certains adeptes de la théorie du virus semblent considérer qu'on ne saurait exiger d'eux la démonstration absolument péremptoire de la réalité du virus. Mais ils pensent que la théorie de l'autolyse, pour mériter de retenir l'attention, devrait prouver irréfutablement l'inexistence de ce mystérieux parasite. On a parfois émis l'idée que l'hypothèse du virus gardera sa force jusqu'au jour où l'on aura indiscutablement constaté l'apparition du pouvoir lytique chez une bactérie totalement exempte antérieurement de cette propriété, et qu'il incombe à la théorie de l'autolyse de fournir une telle démonstration. Mais on ne saurait répondre pleinement à semblable desideratum, car il est généralement reconnu, et à très juste titre, que si l'on réussit parfois à exalter une qualité préexistante, il n'est pas possible de créer de toutes pièces un caractère et de doter ainsi l'être vivant d'une propriété foncièrement nouvelle. D'ailleurs, même si l'on parvenait à rendre manifeste une qualité lytique que rien ne décelait auparavant (ainsi qu'il résulte de diverses expériences citées plus haut et relatives aux réactions entre races de microbe L ou de staphylocoque) les défenseurs de la théorie du virus pourraient toujours objecter qu'en réalité on a opéré sur un microbe porteur d'un parasite occulte mais qui s'est finalement démasqué, ou bien dont la virulence, trop faible à l'origine pour être perceptible, a pu s'accroître au cours de l'expérience. Sous prétexte qu'elle est la première en date et qu'elle a des droits acquis, considérer comme vraie la théorie du virus, si précaire que soit sa justification expérimentale, aussi longtemps qu'on n'aura pas trouvé contre elle les éléments d'un irrécusable verdict, c'est vraiment faire preuve à son égard de quelque partialité. En réalité, la question est de savoir laquelle des deux hypothèses,

celle du virus ou celle de l'autolyse, se concilie le mieux avec l'ensemble des constatations. A notre avis, la théorie du virus se heurte à des difficultés de plus en plus considérables au fur et à mesure que l'investigation se documente; elle a été émise très tôt, peut-être même un peu trop tôt; sans doute ses partisans émettront-ils la même réflexion concernant la théorie de l'autolyse; le lecteur appréciera. Mais, en attendant que l'une ou l'autre des deux théories en présence subisse finalement, et sans que cette fois aucune adaptation soit possible, l'irréversible lyse, l'essentiel est d'amonceler sans relâche les données expérimentales, puisqu'elles finissent d'habitude par se coordonner en se multipliant, et que souvent leur éloquence est fonction de leur nombre.

SUR LA PURIFICATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE AU MOYEN DES PRÉCIPITÉS DE PHOSPHATES DE CHAUX

par G. ABT.

(*Travail du laboratoire du D^r L. MARTIN.*)

Dès leur second mémoire sur la toxine diphtérique, en 1889, Roux et Yersin (1) avaient décrit, avec une précision parfaite, une propriété intéressante de cette toxine : elle est entraînée dans les précipités de phosphates de chaux que l'on produit au sein de ses solutions.

Cette propriété, qui permet de purifier la toxine en séparant les substances azotées toxiques des autres protéines du milieu, semble avoir été oubliée. J'ai pensé que l'on pourrait perfectionner les procédés de Roux et Yersin et dépasser leurs résultats en introduisant dans la méthode trois techniques nouvelles :

1° Dissoudre les précipités de phosphates de chaux à l'aide des citrates alcalins, afin d'obtenir des solutions de toxine purifiée aussi maniables que la toxine brute ;

2° Titrer les solutions de toxine purifiée, comparativement avec la toxine brute, par la méthode de floculation de Ramon, de manière à pouvoir suivre exactement à chaque stade de la préparation le sort de la toxine ;

3° Compléter par la dialyse la dissociation des substances toxiques et des protéines étrangères, opération qui élimine en même temps une grande partie des sels apportés par les réactifs.

L'expression la plus simple et la plus claire du degré de purification d'une toxine est donnée par le calcul des unités toxiques par milligramme de protéines.

Ces termes demandent quelques explications. Lorsqu'on titre une toxine, brute ou purifiée, par la méthode de floculation, on cherche quel est le

(1) Ces *Annales*, 3, 1889, p. 284.

volume d'un sérum antidiphtérique de titre connu qui fait flocculer le plus rapidement une quantité déterminée de toxine. Ce volume de sérum contient, d'après le titrage préalable *in vivo*, n unités antitoxiques (unités Ehrlich, devenues unités internationales). La quantité de toxine qu'il neutralise au point optimum de floculation contiendra n unités toxiques, que je proposerai d'appeler des unités (f) (1). Le chiffre n , divisé par le nombre de centimètres cubes de toxine employés, donne le nombre d'unités toxiques (f) par centimètre cube. Ajoutons que les solutions de toxine purifiée au moyen des précipités de phosphates de chaux flocculent absolument comme les toxines brutes, mais plus lentement. Le retard semble dû à la présence des sels provenant des réactifs. Après une bonne dialyse, la floculation demandera deux ou trois heures, à 45°, avec un sérum qui fait flocculer la toxine brute en une heure à une heure et demie. On peut aussi obtenir la floculation sans dialyse préalable, en quatre ou cinq heures; mais il faut alors diluer, dans la proportion de 6 cent. cubes d'eau distillée pour 4 cent. cubes de toxine.

J'ai calculé la concentration en protéines, par centimètre cube, des toxines diphtériques, brutes ou purifiées, d'après le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. Pour passer du chiffre de l'azote à celui des protéines, j'ai employé arbitrairement le facteur 5, 8, qui correspond à une teneur en azote de 17, 24 p. 100. On se représente mieux la réalité des phénomènes en rapportant les unités toxiques au chiffre des protéines qu'à celui de l'azote.

Les quantités mises en œuvre dans les dosages étant très petites, il est nécessaire de titrer avec une solution d'acide sulfurique centième normale l'ammoniaque distillée. Dans ces conditions, on ne saisit pas exactement le point du virage acide. Pour tourner la difficulté, j'ai eu soin de dépasser légèrement ce point, puis d'introduire une correction par le procédé suivant : On prélève 5 cent. cubes du distillat, que l'on introduit dans un petit tube de 13 à 14 millimètres de diamètre, en verre neutre, et l'on ajoute 0 c. c. 2 d'une solution à 0,04 p. 100 de bleu de bromothymol dans l'alcool à 50°. Puis on fait couler dans le liquide de la soude $n/100$, d'une pipette divisée en centièmes de centimètre cube. Le virage est très net au centième de centimètre cube. On calcule la quantité de soude correspondant au volume total du distillat, et l'on déduit le chiffre obtenu du nombre de centimètres cubes d'acide $n/100$ employé. Le résultat n'est pas rigoureusement exact; une petite erreur s'introduit dans l'extension à un grand volume d'une mesure faite sur 5 cent. cubes, mais ce procédé a l'avantage d'éviter les tâtonnements et les hésitations, tout en étant plus juste que le titrage direct.

De nombreuses expériences ont conduit à régler la préparation de la toxine purifiée de la manière suivante. Supposons que l'on opère sur 40 cent. cubes de toxine brute, chiffre auquel

(1) On sait que l'unité mesurée par la méthode de floculation ne coïncide pas exactement avec l'unité déterminée par le titrage *in vivo*, à cause du rôle différent des toxoïdes dans la neutralisation (Glenny et Wallace, Schmidt et Scholz). Il convient donc de spécifier sur laquelle des deux unités on raisonne; Glenny caractérise les toxines par la dose Lf , quantité exactement neutralisée par l'unité antitoxique; cette dose est une fraction de centimètre cube. Il me semble plus commode et plus simple de noter pour les toxines le nombre d'unités toxiques par centimètre cube, exactement comme on note le nombre d'unités antitoxiques pour les sérums.

je rapporterai, pour plus de clarté, toutes les doses indiquées dans ce mémoire. On place la toxine dans un tube à centrifuger stérile (1), et l'on ajoute, goutte à goutte, 0 c. c. 50 de solution de chlorure de calcium à une molécule par litre. Après dix minutes de repos, on agite, laisse reposer cinq minutes et centrifuge. Ce premier précipité de phosphates de chaux est abandonné. Au liquide décanté, on ajoute 1 cent. cube de solution de phosphate monopotassique à une molécule par litre, puis, goutte à goutte et lentement, 1 c. c. 5 de la solution de chlorure de calcium et 2 cent. cubes de solution normale de soude. On laisse reposer dix minutes, agite vivement une seule fois, et centrifuge après cinq minutes de repos. On décante soigneusement tout le liquide surmontant le précipité et l'on remet ce précipité, pour le laver, en suspension dans 12 à 15 cent. cubes d'eau distillée stérile. Après centrifugation et décantation du liquide de lavage, on redissout le précipité. On commence par le délayer, en s'aidant d'une baguette de verre, dans 0 c. c. 5 de solution de citrate de soude à 20 p. 100; puis on ajoute 10 à 15 cent. cubes d'eau distillée stérile, quelques gouttes d'un indicateur approprié, le rouge de méthyle, et de l'acide citrique en solution à 5 p. 100 jusqu'à ce que la teinte jaune de l'indicateur commence à virer vers le rose (pH 5,8 environ); il faut en général de 1 à 1 c. c. 5 d'acide citrique. On laisse digérer un moment, puis introduit 7 c. c. 5 de la solution de citrate de soude. Si le liquide n'est pas devenu limpide au bout d'un quart d'heure, on peut encore ajouter de l'acide citrique, 1 cent. cube et même davantage, sans que le rouge de méthyle commence à virer. Il arrive que la dissolution ne soit pas complète; il faut alors augmenter, par fractions de 1 cent. cube par exemple, le citrate de soude. Une fois que le liquide est parfaitement clair, on précipite le calcium par addition du volume d'une solution d'oxalate de soude qui correspond exactement à la quantité de calcium employée pour la précipitation; puis on laisse reposer jusqu'au lendemain. On centrifuge alors, décante le liquide surmontant le précipité et le dialyse contre l'eau

(1) On peut réussir la préparation sans opérer aseptiquement. Ayant eu quelques échecs, difficiles à expliquer autrement que par des contaminations, j'ai pris l'habitude de stériliser toute la verrerie, et de faire passer au préalable à l'autoclave tous les réactifs, sauf la solution titrée de soude.

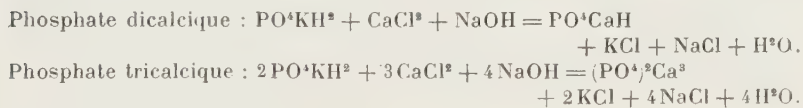
distillée, d'abord pendant deux heures contre un volume d'eau égal à huit fois celui de la toxine primitive, puis pendant six heures contre le même volume d'eau renouvelée. Enfin, on ramène la toxine purifiée au titre de 10 unités toxiques (f) par centimètre cube; pour cela, on la titre par floculation, on concentre dans le vide, ajuste le pH à 7,2-7,4 et complète au volume convenable, calculé d'après le titrage. Si la toxine doit être soit inoculée, soit conservée, on filtre sur bougie Chamberland.

Exposons maintenant point par point les faits qui justifient tous les détails de cette technique.

COMPOSITION DES PRÉCIPITÉS PHOSPHATIQUES.

La composition des précipités de phosphates de chaux ne paraît pas avoir une grande influence sur l'absorption de la toxine diphtérique; ou du moins cette influence n'est pas telle qu'elle ne puisse être masquée, dans les essais comparatifs, par d'autres facteurs prépondérants.

Pour avoir des bases précises de comparaison, j'ai produit dans la toxine brute des précipités soit de phosphate dicalcique, soit de phosphate tricalcique, selon les formules :



Il faut, par molécule de phosphate monopotassique, dans le premier cas une molécule de chlorure de calcium et une de soude; dans le second cas une molécule et demie de chlorure de calcium et deux de soude. La toxine préparée au service de Sérothérapie de l'Institut Pasteur, sur bouillon Martin, contient en moyenne 1 gr. 2 de PO^4 par litre, qui, d'après le pH , doit être à l'état de phosphate disodique pour la majeure partie et de phosphate trisodique pour une faible fraction. On peut calculer que les phosphates contenus dans 40 cent. cubes de toxine correspondent à peu près à 0 c. c. 50 d'une solution de phosphate disodique à 1 mol. par litre. C'est le chiffre dont j'ai tenu compte pour calculer tous les volumes de chlorure de calcium et de soude à ajouter; il était additionné avec les volumes

de phosphate monopotassique effectivement introduits dans la toxine.

Que l'on fasse un précipité de phosphate dicalcique, ou de phosphate tricalcique, pour la même quantité totale de PO_4 , le rendement en toxine absorbée paraît être de même ordre : en général 75 à 80 p. 100 sans dialyse, 55 à 65 p. 100 après dialyse (1). Tantôt les rendements sont supérieurs avec le phosphate tricalcique (expérience 42 : 62,5 p. 100 contre 50 p. 100; expérience 36 : 85,3 p. 100 contre 60,4 p. 100). Tantôt ils sont égaux (expérience 40). Tantôt enfin ils sont supérieurs pour le phosphate dicalcique (expérience 19 : 80 p. 100 contre 60 p. 100; expérience 20 : 64 p. 100 contre 55 p. 100). Mais le phosphate dicalcique entraîne le plus souvent un peu plus de protéines, de sorte qu'en fin de compte le nombre d'unités toxiques par milligramme de protéines est moins élevé. Voici quelques exemples : expérience 19 : triphosphate 0 gr. 360 par centimètre cube; diphosphate 0 gr. 395; expérience 18 : triphosphate 0 gr. 395; diphosphate 0 gr. 480; expérience 42 : triphosphate 0 gr. 260; diphosphate 0 gr. 265. Il y a de rares exceptions (expérience 20 : triphosphate 0 gr. 565; diphosphate 0,475). En général, un chiffre plus fort de protéines correspond à un rendement plus élevé en toxine; mais dans le calcul des unités toxiques par milligramme de protéines les deux valeurs sont représentées, et l'avantage est en général en faveur du phosphate tricalcique :

| | PHOSPHATE tricalcique | PHOSPHATE dicalcique |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Expérience 19 | 14,0 | 12,0 |
| — 20 | 10,5 | 13,7 |
| — 36 | 10,0 | 9,3 |
| — 40 | 14,6 | 14,1 |
| — 42 | 22,1 | 17,4 |

(1) Les chiffres donnés au cours de cet exposé, pour le rendement en toxine récupérée, pour la concentration en protéines et pour les unités toxiques par milligramme de protéines varieront dans de larges limites. Ils ne sont pas tous comparables entre eux; dans certaines expériences, les titrages et analyses ont été faits sans dialyse préalable; d'autre part on a tantôt opéré sur la précipitation totale, tantôt rejeté un premier précipité, correspondant au phosphate contenu dans la toxine brute. Pour les résultats définitifs, au point de vue de la purification de la toxine, il ne faut considérer que l'application complète de la méthode; mais, pour la discussion des diverses opérations, toute série d'expériences faites dans des conditions rigoureusement semblables a sa valeur, et a pu être utilisée.

Le phosphate tricalcique a, en outre, l'avantage d'être un peu plus facile à redissoudre. Je l'ai donc adopté en principe pour le précipité dans lequel on recueille la toxine entraînée; au contraire, comme on le verra plus loin, le phosphate dicalcique est préférable pour le premier précipité, qu'on rejette, et dans lequel on doit chercher à entraîner moins de toxine et plus de protéine. Il résulte néanmoins des chiffres cités que, pour déterminer rigoureusement quelle est l'influence de la composition du précipité, il faudrait être certain d'éliminer d'autres facteurs de variation, dont il sera question plus loin.

Un fait curieux, aussi net que constant, est l'amélioration du rendement en toxine entraînée, lorsqu'on fait la précipitation avec un excès de chlorure de calcium : par exemple, au lieu de 1,5 molécule de Ca pour 1 molécule de PO_4 , 2 à 3 molécules de Ca. Dans un groupe de 6 expériences, j'ai pu obtenir ainsi des rendements en toxine de 80, 82, 88, 88,7, 89 et 93 p. 100; taux supérieurs en moyenne de 10 p. 100 aux plus élevés que donne le phosphate tricalcique (sans qu'il y ait d'ailleurs de proportionnalité entre la quantité de calcium en excès et l'accroissement du rendement). En opérant sur la même toxine, en même temps et toutes autres conditions identiques, j'ai eu les résultats suivants :

| | RENDEMENTS p. 100 |
|---|----------------------|
| Expérience 14 (sans dialyse) : | — |
| a) Phosphate tricalcique | 80,0 |
| b) Excès de Ca : 1,18 molécule. | 93,3 |
| Expérience 15 (avec dialyse) : | |
| c) Phosphate tricalcique | 46,5 |
| b) Excès de Ca : 1,18 molécule. | 58,0 |
| Expérience 19 (avec dialyse) : | |
| a) Phosphate tricalcique | 60,0 |
| b) Excès de Ca : 0,39 molécule. | 80,0 |

Mais la quantité de protéines étrangères entraînée augmente encore plus que celle de toxine; le nombre d'unités toxiques par milligramme de protéines diminue donc, bien que la toxine obtenue soit plus forte.

| | PROTÉINES en milligr. par cent. cube | UNITÉS TOXIQUES par milligr. de protéines |
|-----------------|--|---|
| Expérience 14 : | | |
| a. | 1,020 | 7,0 |
| b. | 1,420 | 5,8 |
| Expérience 15 : | | |
| a. | 0,430 | 14,2 |
| b. | 0,682 | 8,6 |
| Expérience 19 : | | |
| a. | 0,360 | 14,0 |
| b. | 0,427 | 11,1 |

L'addition d'un excès de chlorure de calcium n'est donc pas avantageuse pour la purification de la toxine ; j'y ai renoncé par la suite.

L'influence d'alcali, en excès sur la quantité nécessaire pour produire le phosphate tricalcique, est minime et pratiquement négligeable.

MANIÈRE DE PRODUIRE LE PRÉCIPITÉ DE PHOSPHATES.

La façon dont le précipité prend naissance et se propage à travers la masse liquide a une importance capitale. L'adsorption de la toxine est un phénomène très subtil, que je n'ai pas réussi jusqu'à présent à contrôler avec une maîtrise parfaite. De là des différences, de l'ordre de 20 à 25 p. 100, entre des préparations dont tous les facteurs sont identiques en apparence. Les seules indications sur les causes de ces variations qui se soient dégagées des expériences sont les suivantes :

1° La quantité de toxine adsorbée est plus faible, en même temps que la dissolution du précipité plus facile, si l'on ajoute la soude avant le chlorure de calcium, que si l'on suit l'ordre inverse ; dans deux opérations parallèles, sur la même toxine, le rendement était par exemple de 41,4 p. 100 dans le premier cas et de 60 p. 100 dans le second, ou de 56 p. 100 d'un côté et de 65,7 p. 100 de l'autre. L'adsorption des protéines étrangères suit la même règle.

2° Le précipité doit être produit très lentement. En versant rapidement le chlorure de calcium, puis la soude, dans la

toxine additionnée de phosphate monopotassique, et en agitant immédiatement le mélange, j'ai obtenu un rendement de 35.2 p. 100, alors que, en laissant tomber les deux réactifs goutte à goutte et lentement, j'atteignais un rendement de 60 p. 100. Peut-être parviendrait-on à éliminer les différences constatées parfois entre les tubes d'une même série si l'on réglait au moyen d'un dispositif mécanique la vitesse et le mode d'écoulement du chlorure de calcium et de la soude dans la toxine.

Au bout de combien de temps convient-il de rassembler par centrifugation le précipité? Faut-il le laisser s'agglomérer peu à peu spontanément, ou chercher à renouveler le contact avec la toxine restée en solution; par une ou plusieurs agitations avec une baguette de verre? J'ai centrifugé au bout de quinze minutes ou au bout d'une heure, soit en laissant au repos complet dans l'intervalle, soit en agitant une fois après dix minutes dans le premier cas, trois fois après dix, vingt et quarante minutes dans le second cas. Un seul fait a été parfaitement net : lorsqu'on laisse au repos, une partie du précipité se dépose sur les parois du verre et y reste après la centrifugation. Le précipité est aussi plus difficile à redissoudre. Quant à l'ordre dans lequel se rangent les quatre modes opératoires, soit pour le rendement en toxine adsorbée, soit pour le nombre d'unités toxiques par milligramme de protéine, il a changé d'une série d'essais à une autre, et il n'était pas le même selon que l'on envisage l'activité ou la pureté de la toxine récupérée. En centrifugeant, par commodité, au bout d'un quart d'heure, il m'a paru avantageux d'agiter une fois, dix minutes après l'addition des réactifs, pour répartir à nouveau le précipité dans le liquide; c'est le procédé que j'ai adopté.

PRÉCIPITATION FRACTIONNÉE.

Le filtrat d'une culture de bacilles diphtériques contient des substances protéiques dont les propriétés physiques, à l'égard notamment de l'adsorption par les précipités de phosphates et de la dialyse, sont très voisines de celles de la toxine. Il y a une zone de précipitation, dans laquelle la proportion de protéines étrangères par rapport à la toxine est minima. Pour

délimiter cette zone, il fallait procéder par précipitations successives, avec des doses faibles de réactifs, et étudier chaque précipité séparément.

J'ai produit, dans la même prise d'essai de toxine, quatre précipités successifs correspondant chacun à 0 c. c. 50 de solution de phosphate monopotassique mol./1 (pour le premier de ces précipités, cette quantité de phosphate est fournie par la toxine brute, sans addition supplémentaire). Voici, pour trois expériences [I, II, III (1)], les résultats obtenus pour le rendement en toxine, la concentration en protéines par centimètre cube, et le nombre d'unités toxiques par milligramme de protéines :

| | 1 ^{re} FRACTION | | | 2 ^e FRACTION | | |
|--|--------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|
| | I | II | III | I | II | III |
| Toxine entraînée (en p. 100 de la toxine originale) . . . | 8,45 | 16,48 | 9,4 | 20,15 | 26,3 | 21,8 |
| Protéines en <i>milligrammes</i> par centimètre cube | 0,948 | 4,989 | 1,813 | 0,577 | 1,607 | 1,341 |
| Unités toxiques par <i>milligramme</i> de protéines . . . | 3,5 | 2,3 | 1,4 | 13,3 | 4,6 | 4,6 |

| | 3 ^e FRACTION | | | 4 ^e FRACTION | | |
|--|-------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|
| | I | II | III | I | II | III |
| Toxine entraînée (en p. 100 de la toxine originale) . . . | 16,0 | 26,3 | 19 | 9,8 | 16,3 | 10,2 |
| Protéines en <i>milligrammes</i> par centimètre cube | 0,422 | 1,348 | 1,107 | 0,573 | 1,165 | 1,156 |
| Unités toxiques par <i>milligramme</i> de protéines . . . | 14,5 | 5,5 | 4,8 | 6,4 | 3,9 | 3,3 |

Il est évident que la plus grande partie de la toxine est entraînée dans le deuxième et le troisième précipité. C'est, de plus, dans ces précipités qu'elle est le mieux purifiée. En abandonnant le premier et le quatrième, on perd une quantité appréciable de toxine; mais comme l'addition de ces précipités

(1) Les expériences II et III ont été faites avec la même toxine, qui était particulièrement pauvre en unités toxiques (*f*) et riche en protéines; le précipité produit était du phosphate tricalcique dans l'expérience II et du phosphate dicalcique dans l'expérience III.

apporterait une fraction de toxine moins riche en unités toxiques par milligramme de protéines, elle conduirait à une préparation globale moins pure. J'ai donc adopté la technique suivante : Rejeter le premier précipité, obtenu avec le phosphate contenu dans la toxine brute; entraîner ensuite le reste de la toxine dans le précipité produit avec 1 cent. cube de solution de phosphate monopotassique mol./1, pour 40 cent. cubes de toxine originale.

Pour chiffrer l'importance de la perte qui résulte de l'abandon du premier précipité, j'ai réuni les précipités provenant de 4 prises de 40 cent. cubes de toxine, et calculé le rapport de la toxine récupérée dans ces 4 précipités à celui de la toxine totale; j'ai trouvé 16,4 p. 100. D'autre part, dans un essai où les 4 précipités avaient donné, réunis, un rendement de 60 p. 100, j'ai pu retirer de la toxine restant, par une précipitation massive, encore 17,8 p. 100 des unités toxiques (*f*) originales; mais la quantité de protéines était alors très élevée. Cette expérience montre néanmoins que l'on pourrait, en négligeant le point de vue de la purification de la toxine, entraîner par des précipités de phosphate de chaux à peu près la totalité des substances toxiques.

On remarque que, dans certains cas, le rendement de la quatrième fraction est encore assez élevé, et son nombre d'unités toxiques par milligramme de protéines assez voisin de celui de la troisième fraction. J'ai fait un essai de précipitation en deux temps, suivant le principe adopté, mais en employant comparativement pour le second temps 1 c. c. 2 au lieu de 1 cent. cube de phosphate monopotassique (expérience 42). Il s'est trouvé que le rendement en toxine n'a pas augmenté : 62,5 p. 100. Mais la concentration en protéines est passée de 0,260 à 0,485, ce qui a fait tomber les unités toxiques par *milligramme* de protéines de 22,1 à 11,9. Le chiffre de 1 cent. cube de solution phosphatique m'a donc paru préférable.

Dans cette méthode de précipitation en deux temps, faut-il se servir de phosphate dicalcique ou de phosphate tricalcique? Les observations que j'ai rapportées dans la discussion générale de cette question se sont confirmées dans le cas particulier. Ayant néanmoins l'impression que le phosphate dicalcique entraînerait un peu moins de toxine et un peu plus de pro-

téines, je crois indiqué de l'employer pour la première précipitation, en réservant au contraire le phosphate tricalcique pour la deuxième. Ces choix sont en partie justifiés par certaines expériences. Ainsi, dans l'expérience 59, quand le premier précipité était du phosphate dicalcique, le second a donné 60 p. 100 de rendement en toxine, 0,276 *milligrammes* de protéines par centimètre cube et 21,7 unités toxiques par *milligramme* de protéines; quand le premier précipité était du phosphate tricalcique, les chiffres correspondants étaient 55,5 p. 100, 0,293 et 18,8. L'avantage est moins manifeste dans l'expérience 52 : phosphate dicalcique : 65,5 p. 100; 0,300; 22,5 unités. Phosphate tricalcique : 59,2 p. 100; 0,268; 22,8 unités. Quant au choix du phosphate tricalcique pour la précipitation finale, le premier temps ayant été identique dans les deux cas, l'expérience 42 a donné le résultat suivant : phosphate tricalcique : rendement en toxine 62,5 p. 100; protéines 0,260; unités toxiques par *milligramme* 22,1. Phosphate dicalcique : 50 p. 100; 0,265; 17,4 unités.

Enfin, pour confirmer la supériorité de la méthode de précipitation fractionnée, je citerai les résultats comparatifs de l'expérience 48, qui est celle dans laquelle la précipitation en une seule fois m'a donné le chiffre le plus élevé d'unités toxiques par *milligramme* de protéines :

| | RENDEMENT en toxine | PROTÉINES par cent. cube | UNITÉS TOXIQUES par <i>milligr.</i> de protéines |
|---------------------------------|------------------------|-----------------------------|--|
| Précipitation en une fois . . . | 62,7 | 0,337 | 17,4 |
| Précipitation en deux temps. . | 51,3 | 0,207 | 22,8 |

DISSOLUTION DES PRÉCIPITÉS PHOSPHATIQUES.

Le meilleur dissolvant des précipités de phosphates de chaux serait une solution de citrate d'ammonium. Ayant en vue l'injection sous-cutanée de la toxine purifiée, après transformation en anatoxine, j'ai jugé qu'il valait mieux renoncer à l'emploi d'un sel ammoniacal.

La solubilité dans le citrate de soude est bien moindre. Il faut employer une solution concentrée, à 20 p. 100; et le volume nécessaire serait encore excessif si l'on ne pouvait pas achever la dissolution du précipité par l'addition d'une petite

quantité d'acide phosphorique. On commence par bien délayer le précipité, à l'aide d'une baguette de verre, dans une très petite quantité, 0 c. c. 5 environ, de solution de citrate. Puis on verse d'un seul coup 12 à 14 cent. cubes de la même solution. Le précipité se dissout ou se disperse, et le liquide prend un aspect laiteux. En présence d'un indicateur, de préférence le rouge de phénol, on ajoute goutte à goutte une solution mol/1 d'acide phosphorique, jusqu'à ce que le liquide devienne limpide, ou que la teinte de l'indicateur montre que l'on approche de $pH=7,0$. Si l'on atteint cette réaction sans que le trouble ait disparu, on procède par petites additions de citrate de soude et d'acide phosphorique alternativement. Il faut, en général, au total de 13 à 15 cent. cube de solution de citrate à 20 p. 100, et de 0,5 à 0,7 cent. cube de solution d'acide phosphorique mol/1. Les quantités varient un peu, même pour les divers tubes d'une série traités jusqu'à ce point de la préparation d'une façon en apparence identique. Je ne puis attribuer ces irrégularités qu'à la manière dont a pris naissance le précipité.

Par la suite, j'ai modifié cette technique, en vue de diminuer les quantités des réactifs introduits dans la toxine par cette opération. Après avoir délayé le précipité dans 0 c. c. 5 de citrate de soude, on ajoute 10 à 15 cent. cubes d'eau distillée stérile, et 4 gouttes d'un indicateur dont le virage vers l'acidité débute au-dessous de $pH=6,0$, le rouge de méthyle. On laisse tomber ensuite, en agitant, quelques dixièmes de centimètre cube d'une solution à 5 p. 100 d'acide citrique, jusqu'au début du virage acide. Il faut, en moyenne, de 0,7 à 1,5 cent. cube de cette solution (plus la quantité nécessaire pour atteindre le virage est élevée, plus la dissolution devient facile par la suite). Puis on verse d'un coup 7,5 cent. cubes de la solution de citrate de soude. Parfois, le liquide s'éclaircit d'emblée. Le plus souvent, il faut encore ajouter, par petites fractions, 1 à 2 cent. cubes de la solution d'acide citrique. Rarement une nouvelle addition de 1 cent. cube, ou même 2 cent. cubes de citrate de soude est nécessaire. On emploie au total 7 à 9 cent. cubes de solution de citrate de soude à 20 p. 100, en moyenne 8 cent. cubes, et 2 c. c. 5 à 3 c. c. 5 de solution à 5 p. 100 d'acide citrique. En calculant en citrate de soude à 20 p. 100 la

totalité de l'ion citrique, on arrive à une somme de 8 c. c. 6 à 10 cent. cubes au maximum. Il y a donc une économie sérieuse sur le premier procédé.

De plus, cette technique paraît conduire à de meilleurs rendements ou à une meilleure purification, sans doute parce que les résultats de la dialyse subséquente deviennent plus favorables. Dans l'expérience 51, on obtenait pour le procédé acide citrique-citrate : Rendement en toxine, 59 p. 100 ; protéines par centimètre cube, 0,268 ; unités toxiques par *milligramme* de protéines, 22,8 ; et pour le procédé citrate-acide phosphorique : Rendement en toxine, 51 p. 100 ; protéines, 0,276 ; unités toxiques, 19. L'expérience 52 a été également à l'avantage du procédé acide citrique-citrate, mais cette fois c'est seulement sur la concentration en protéines qu'a portée la différence : 0,288 contre 0,377. Le rendement en toxine était 66 p. 100 dans les deux cas ; le calcul des unités toxiques par *milligramme* de protéines a donné 23,5 pour le procédé acide citrique-citrate et 17,9 pour l'autre.

En restant en milieu alcalin ou neutre au rouge de méthyle, on ne risque pas de précipiter de la toxine diphtérique par la réaction acide (méthode de Glenny et Walpole, v. Groër, Watson et Wallace, Sdrodowski et Chalapina, Koulikoff et Smirnoff).

Le citrate de soude ramène une réaction plus alcaline ; lorsque la dissolution est terminée, le *pH* est 6,6 à 6,8. Mais, après dialyse, on peut très bien ajouter un peu de soude, et obtenir un *pH* de 7,2 à 7,4, et même de 8,4, sans provoquer la précipitation des restes de phosphate de chaux.

En substituant l'acide chlorhydrique normal à l'acide citrique dans la première addition de cet acide, on a souvent un reste de précipité phosphatique qui résiste à la dissolution. Par contre, on peut remplacer l'acide citrique par l'acide chlorhydrique pour terminer l'opération ; toutefois, la quantité de sels qui persiste après la dialyse est un peu plus élevée. L'acide phosphorique dissout moins bien que l'acide citrique.

La solubilisation des précipités de phosphates de chaux dans les citrates résulte d'un équilibre, qui ne s'établit avec le minimum de réactifs que dans des conditions déterminées et difficiles à analyser. J'ai noté qu'elle était plus facile à atteindre

quand on ajoutait d'un coup une quantité de solution de citrate de soude voisine de celle qui sera finalement nécessaire, que lorsqu'on procédait par fractions. D'autre part, la transformation — en sels doubles probablement — n'est pas instantanée. Il faut laisser digérer quinze à vingt minutes au moins entre l'addition de citrate de soude et celle d'acide citrique terminale. Dans ces conditions, le trouble disparaît parfois avec une étonnante facilité; mais, si l'on manque l'opération, on peut être amené à ajouter une quantité de citrate qui augmente de 50 p. 100 le total.

DIALYSE.

Lorsqu'on parle de dialyse à propos de la toxine diphtérique, il est essentiel de préciser de quelle membrane dialysante on se sert. Certaines membranes laissent passer presque intégralement la toxine, d'autres présentent à son égard une imperméabilité presque complète. Les auteurs qui ont publié sur la dialyse de la toxine diphtérique des travaux fort intéressants (Glenny et Walpole) m'excuseront de ne pas aborder ici la discussion de cette question. J'indiquerai les résultats que j'ai obtenus avec les membranes que j'ai employées, sachant parfaitement qu'avec d'autres membranes ils auraient pu être complètement différents.

Après quelques essais avec des sacs de collodion de composition diverse, j'ai adopté la cellophane, qui se trouve dans le commerce, en France, sous trois épaisseurs. La plus mince m'a paru la meilleure, sans que les différences avec la moyenne et même la plus épaisse soient considérables. On se procure des feuilles de 1 mètre carré, et l'on y découpe des morceaux, que l'on monte à la manière du dialyseur de Graham. Pour la solution du précipité produit dans 40 cent. cubes de toxine brute, j'ai employé une surface dialysante de 41 cent. carrés, calculée d'après le diamètre du manchon de verre. Par des tâtonnements qu'il serait trop long de rapporter, j'ai fixé à 320 cent. cubes la quantité d'eau distillée placée dans le vase extérieur (8 fois le volume de la toxine originale). Les expériences qui suivent ont établi qu'il convenait de changer une fois ce liquide extérieur au bout de deux heures à deux heures et demie, et de donner à

la dialyse totale une durée de huit à neuf heures. Dans ces conditions, la solution de phosphate et citrate de sodium et de calcium est dialysée contre 16 fois le volume de la toxine originale,

Si l'on détermine le rendement en toxine, la concentration en protéines et le nombre d'unités toxiques par *milligramme* des protéines avant la dialyse, puis après huit heures, vingt-quatre heures, quarante-huit heures, soixante-douze heures de dialyse (en changeant le liquide extérieur après chacun de ces intervalles de temps), on suit exactement la marche du phénomène. Il se règle sur le schéma suivant : pendant les huit premières heures, il passe à l'extérieur plus de protéines étrangères que de toxine ; entre huit heures et vingt-quatre heures, les deux groupes de substances traversent sensiblement dans les mêmes proportions ; au delà de vingt-quatre heures, la toxine continue à passer à peu près avec la même vitesse, tandis que la dialyse des protéines étrangères se ralentit. Il semble donc que, parmi les protéines étrangères entraînées avec la toxine dans le précipité de phosphate, une fraction importante soit à molécules plus petites que la toxine elle-même, une fraction à molécules sensiblement de même grosseur et une fraction à molécules plus grosses. Si cela est vrai, on ne conçoit pas la possibilité de réaliser une purification tout à fait complète de la toxine par le moyen de la dialyse. L'expérience 17 donne un bon exemple de ces faits :

| | RENDEMENT en toxine p. 100 | PROTÉINES en <i>milligr.</i> par cent. cube | UNITÉS TOXIQUES par <i>milligr.</i> de protéines |
|---------------------------|----------------------------------|---|--|
| Avant dialyse | 70,0 | 0,985 | 6,6 |
| Après 8 heures | 62,5 | 0,567 | 10,4 |
| Après 23 heures | 50,0 | 0,440 | 10,8 |

La perte de toxine dans les huit premières heures de dialyse a atteint 10 p. 100, et l'élimination des protéines étrangères 12,4 p. 100 : la toxine intérieure s'est donc notablement purifiée. Entre 8 heures et 23 heures, on a perdu 20 p. 100 de la toxine et 22,4 p. 100 des protéines ; le nombre d'unités toxiques par milligramme de protéines n'a pas sensiblement varié. De même dans l'expérience 48, la perte de toxine entre huit et vingt-quatre heures a été de 17,5 p. 100, et l'élimination des

protéines étrangères de 19,0 p. 100; les unités toxiques par milligramme de protéines sont passées de 21,4 à 21,9. Ce gain insignifiant ne compense pas la diminution du rendement.

Lorsqu'on prolonge la dialyse, après avoir changé l'eau, on perd entre vingt-quatre et quarante-huit heures environ 50 p. 100 de la toxine. La diminution des protéines est variable; dans une expérience, le nombre d'unités toxiques par milligramme est passé de 4,4 à 6,2; dans une autre, il est tombé de 11,2 à 6,75. En tout cas, le rendement en toxine devient trop faible pour rester intéressant, même lorsqu'il y a un léger progrès dans la purification. Entre quarante-huit heures et soixante-douze heures, la perte de toxine est de nouveau d'environ 50 p. 100. Toutes ces observations justifient le choix d'une période de dialyse de huit heures.

J'ai vérifié qu'il n'y avait pas intérêt à changer l'eau extérieure deux fois pendant cette période, au lieu d'une seule fois. Dans l'expérience 17, citée plus haut, j'ai obtenu, en changeant deux fois, un rendement de 50 p. 100, 0,469 de protéines et 10,1 unités toxiques par milligramme de protéines: donc diminution du rendement, sans purification.

Il vaut mieux changer l'eau extérieure au bout de deux heures qu'au bout de quatre heures; le rendement est en général un peu plus élevé et la toxine plus pure:

| | RENDEMENT en toxine p. 100 | PROTÉINES en milligr. par cent. cube | UNITÉS TOXIQUES par milligr. de protéines |
|--------------------------------|----------------------------------|--|---|
| Expérience 51 : | | | |
| Dialyse 2 + 6 heures | 59,2 | 0,268 | 22,8 |
| Dialyse 4 + 4 heures | 42,3 | 0,203 | 21,5 |
| Expérience 53 : | | | |
| Dialyse 2 + 6 heures | 67,8 | 0,284 | 21,4 |
| Dialyse 4 + 4 heures | 55,5 | 0,276 | 18,4 |
| Expérience 57 : | | | |
| Dialyse 2 + 6 heures | 50,0 | 0,247 | 20,2 |
| Dialyse 4 + 4 heures | 45,0 | 0,305 | 14,9 |

La dialyse entraîne une dilution. Le rapport du volume de la toxine originale à celui de la toxine purifiée est de 1 à 1 15-1,30 environ. La dilution s'ajoutant aux pertes de toxine, le pouvoir floculant ou le pouvoir toxique par centimètre cube sont nota-

blement inférieurs à ceux de la toxine originale; il est facile de les rétablir au taux de départ, par concentration dans le vide. Si le produit purifié doit être inoculé, on peut ensuite, avant de l'amener au volume calculé pour obtenir le nombre original d'unités (*f*) par centimètre cube, ajouter la quantité de soude nécessaire pour produire un *pH* de 7,2 à 7,4.

On pourrait être tenté de recueillir, dans une opération conduite aseptiquement, la toxine qui est passée dans le liquide extérieur. Après concentration de ce liquide dans le vide, j'ai retrouvé, dans la fraction dialysée de la vingtième à la quarante-quatrième heure, 15,8 p. 100 de la toxine originale. La concentration en protéines était de 0 milligr. 090 par centimètre cube; le calcul des unités toxiques par milligramme de protéines donnait le chiffre de 19,5. On obtient mieux avec la précipitation fractionnée suivie de dialyse, et la technique est beaucoup moins laborieuse.

ELIMINATION DU CALCIUM.

Lorsqu'on purifie par la même méthode de l'anatoxine (1), et qu'on injecte au cobaye, sous la peau, une quantité de produit purifié correspondant à 1 cent. cube d'anatoxine originale, on constate fréquemment, au bout de quelques jours, au point d'inoculation une petite induration du volume d'un grain de chènevis à celui d'un grain de millet. La peau semble se dessécher peu à peu à ce niveau, puis il se forme, au milieu de tissu apparemment sain, un petit perluis qui donne issue à un peu de substance sèche, crayeuse. Après injection de 5 cent. cubes, on observe un petit placard induré, absolument torpide, qui persiste indéfiniment. J'ai prélevé un de ces placards pour en faire l'analyse: il contenait 46,5 p. 100 de cendres, constituées en presque totalité par du phosphate tricalcique, avec un petit excès de calcium. Ces indurations proviennent donc de ce que, sous la peau, le citrate de soude diffuse, en abandonnant sur place du phosphate de calcium. Pour prévenir cet inconvénient, il faut éliminer le calcium de la toxine purifiée.

Divers essais m'ont convaincu que le seul réactif utilisable

(1) Les observations qui suivent ne peuvent être faites que sur un produit dépourvu de toxicité, car elles exigent l'injection d'une quantité assez forte de ce produit.

pour la précipitation du calcium était l'oxalate de sodium, qui s'emploie commodément en solution demi-normale, c'est-à-dire à $1/4$ molécule par litre. La totalité du calcium que l'on introduit dans la toxine brute sous la forme de chlorure se retrouve dans les précipités de phosphate tricalcique. On peut donc calculer, d'après le chlorure de calcium ajouté, le volume de solution d'oxalate de sodium nécessaire pour éliminer le calcium de la dissolution de ces précipités. Si l'on a employé 1 c. c. 5 de CaCl_2 mol/1 pour 40 cent. cubes de toxine brute, on aura à éliminer 60 milligrammes de Ca, auxquels correspondent 6 cent. cubes de solution $n/2$ d'oxalate de sodium. Mais la précipitation du calcium à l'état d'oxalate n'est pas totale à froid, dans ces conditions. Il y aurait inconvénient à augmenter la quantité d'oxalate, l'excès ne pouvant être éliminé que partiellement par la dialyse ultérieure. J'ai employé généralement 6 c. c. 25 de solution d'oxalate et laissé le produit à la glacière jusqu'au lendemain matin, avant de filtrer ou plus souvent de centrifuger. L'addition d'acétate de sodium (0 gr. 500) n'a aucune influence sur la précipitation du calcium.

On éliminera, par exemple, par la précipitation à l'état d'oxalate 68 p. 100 du calcium, ce qui laissera subsister 0 *milligr.* 48 de Ca par cent. cube de toxine purifiée, ramenée au volume de la toxine originale. Après la dialyse, il restera encore 0 *milligr.* 125 de Ca par centimètre cube (8.3 p. 100 du calcium contenu dans le précipité). Ces chiffres sont parmi les plus faibles; le taux moyen du calcium, sous le volume initial, est plutôt de 0 *milligr.* 200 à 0 *milligr.* 250 par centimètre cube. De pareilles quantités ne laissent généralement aucune trace au point d'inoculation, lorsqu'on injecte sous la peau du cobaye de 1 à 5 cent. cubes de produit purifié.

Certaines expériences (n° 26, comparé aux n°s 13 et 17) avaient paru indiquer que la présence du calcium avait une influence sur le passage, à travers la membrane dialysante, de la toxine d'une part, et des protéines étrangères de l'autre; elle aurait favorisé l'élimination des protéines et entravé celle de la toxine. Il aurait donc été plus avantageux de précipiter seulement après la dialyse le calcium restant. Ces faits n'ont été que partiellement confirmés par les expériences de vérification, comme le montre le tableau A.

TABLEAU A.

| | RENDEMENT en toxine p. 100 | PROTÉINES en milligr. par cent. cube | UNITÉS TOXIQUES par milligr. de protéines | Ca par cent. cube |
|------------------------------------|----------------------------------|--|---|----------------------|
| Expérience 30 : | | | | |
| Précipitation avant dialyse . . . | 57,2 | 0,637 | 9,8 | 0,335 |
| Précipitation après dialyse. . . . | 65,7 | 0,528 | 13,6 | 0,216 |
| Expérience 42 : | | | | |
| Précipitation avant dialyse. . . . | 45,9 | 0,158 | 23,2 | " |
| Précipitation après dialyse. . . . | 49,5 | 0,223 | 17,7 | " |
| Expérience 55 : | | | | |
| Précipitation avant dialyse. . . . | 67,8 | 0,284 | 21,4 | 0,236 |
| Précipitation après dialyse. . . . | 67,8 | 0,256 | 23,8 | 0,300 |
| Expérience 57 : | | | | |
| Précipitation avant dialyse. . . . | 50,0 | 0,247 | 20,2 | 0,267 |
| Précipitation après dialyse. . . . | 53,0 | 0,243 | 21,7 | 0,218 |

On voit que si, le plus souvent, la dialyse placée avant l'élimination de la chaux entraîne une augmentation du rendement en toxine, une diminution de la concentration en protéines, avec la purification qui en est la conséquence, et une diminution du taux du calcium, aucune de ces propriétés n'est tout à fait constante. La méthode a, par contre, l'inconvénient d'exiger après la dialyse un dosage du calcium restant, afin de déterminer le volume de la solution d'oxalate de sodium à employer. Ce calcium représente environ 60 p. 100 de celui que contenait le chlorure de calcium introduit (59,7; 57,3; 66; 61), et 1 *milligramme* par centimètre cube en chiffre absolu. Après l'addition d'oxalate de sodium, il en reste en solution à peu près autant que lorsqu'on précipite avant la dialyse. Par contre, on est conduit à conserver intégralement l'oxalate de sodium correspondant au calcium non précipité, tandis que dans le premier procédé la dialyse ultérieure peut en éliminer les trois quarts.

RÉSULTATS.

Pour comparer la toxine purifiée à la toxine originale, j'ai calculé dans le tableau B, pour 10 des toxines qui ont servi aux expériences, les unités toxiques (*f*) par centimètre cube, les

protéines en *milligramme* par centimètre cube, et les unités toxiques par *milligramme* de protéines.

TABLEAU B. — **Toxines originales.**

| NUMÉROS | UNITÉS (f) par cent. cube | PROTÉINES en <i>milligr.</i> par cent. cube | UNITÉS TOXIQUES par <i>milligr.</i> de protéines |
|-------------------|------------------------------|---|--|
| 1 | 11 | 19,69 | 0,55 |
| 2 | 9 | 20,09 | 0,44 |
| 3 | 7 | 17,86 | 0,39 |
| 4 | 8 | 17,86 | 0,45 |
| 5 | 8 | 14,21 | 0,56 |
| 6 | 12 | 15,91 | 0,75 |
| 7 | 13 | 19,33 | 0,67 |
| 8 | 11 | 20,30 | 0,54 |
| 9 | 10 | 17,13 | 0,58 |
| 10 | 9 | 14,78 | 0,60 |
| Moyenne | 9,8 | 17,71 | 0,55 |

Le simple entraînement par le phosphate tricalcique, en un seul temps et sans dialyse, a donné des rendements en toxine de 70 à 80 p. 100, et de 77 à 93 p. 100 lorsqu'on employait un excès de calcium. Le taux des protéines était de 1 *milligr.* 020 à 1 *milligr.* 420; les unités toxiques par *milligramme* de protéines variaient de 5 à 8.

En faisant suivre la précipitation en un temps de la dialyse, le rendement en toxine est tombé à 47 p. 100 au minimum et a atteint encore 84 p. 100 au maximum; le taux des protéines a varié de 0,425 à 1,070, les unités toxiques par *milligramme* de 8,6 à 14,6. Les moyennes respectives de 15 opérations étaient : rendement, 61 p. 100; protéines, 0,626; unités toxiques par *milligramme*, 11.

Avec la précipitation en deux temps, suivie de dialyse, les chiffres extrêmes ont été : rendement en toxine 45,9 à 73,6 p. 100; protéines 0,158 à 0,337; unités toxiques par *milligramme* 19 à 26,4; et les moyennes respectives de 18 expériences : 57,9 p. 100; 0,251 et 22,35. On voit par ces derniers chiffres, les seuls qui s'appliquent à la méthode sous sa forme définitive, que le rapport des unités toxiques par *milligramme* dans la toxine purifiée et la toxine brute est en moyenne de 40,6; c'est ce que l'on pourrait appeler *l'indice de purification*. En d'autres termes, pour la même quantité de protéines, il y a

dans la toxine purifiée plus de quarante fois plus de toxine. Quant à la teneur en protéines, dans un volume de toxine purifiée ramené au volume de la toxine originale, il ne reste plus que 1,41 p. 100 des protéines primitives.

Ce dernier calcul n'est pas rigoureusement correct, car il ne tient pas compte de la perte de toxine. Le degré de purification doit être évalué sur la toxine concentrée après la purification de manière à rétablir le titre original en unités toxiques par centimètre cube. Voici les résultats obtenus pour quelques toxines concentrées de cette manière.

| | UNITÉS par cent. cube de toxine originale | UNITÉS par cent. cube de toxine purifiée | UNITÉS TOXIQUES par <i>milligr.</i> de protéines | INDICE de purification | PROTÉINES par cent. cube en <i>milligr.</i> | PROTÉINES p. 100 du taux original |
|-----------------------------|---|--|--|---------------------------|---|---|
| Expérience 43 . . . | 8 | 8 | 23,2 | 51,6 | 0,344 | 1,93 |
| Expérience 44 . . . | 8 | 8 | 21,2 | 37,8 | 0,379 | 2,66 |
| Expérience 54 . . . | 10 | 10 | 26,4 | 45,5 | 0,378 | 2,20 |
| Expérience 55 <i>a)</i> . . | 9 | 9 | 24,4 | 35,7 | 0,419 | 2,83 |
| Expérience 55 <i>b)</i> . . | 9 | 9 | 23,8 | 39,7 | 0,376 | 2,53 |

Pour la même teneur en unités toxiques (f), on a donc éliminé 97 à 98 p. 100 des protéines étrangères.

La solution de toxine purifiée contient, malgré la dialyse, une certaine quantité de sels. Dans des toxines ramenées au taux initial d'unités toxiques (f), j'ai trouvé des chiffres de 3,180 (exp. 54) et 2,800 (exp. 59) p. 100 d'extrait sec, dans lesquels entrent seulement environ 35 à 40 *milligrammes* de protéines. Le dosage du calcium donnait des quantités de 0 *milligr.* 282, 0 *milligr.* 360, 0 *milligr.* 369 par centimètre cube, c'est-à-dire des chiffres de même ordre que pour les quantités de protéines. Quant à l'ion phosphate, il n'atteignait, dans l'expérience 59, que 0,160 p. 100. La presque totalité des sels de la toxine purifiée est donc constituée par du citrate de soude. L'injection sous-cutanée de 1 cent. cube d'une solution à 2,5-3 p. 100 environ de citrate de soude, amenée à un pH un peu supérieur à 7,0, injection qui serait à envisager pour la vaccination avec une anatoxine purifiée, est certainement sans inconvénients.

Une toxine purifiée, à 25 unités toxiques environ par *milligramme* de protéines, ne doit pas encore être considérée comme entièrement débarrassée de protéines étrangères. Il nous paraît évident qu'il existe dans la toxine originale des substances protéiques dont les propriétés physiques sont extrêmement voisines de celles de la toxine, et qui n'en seront peut-être jamais séparables soit par absorption, soit par dialyse.

Dans l'intéressante étude que Watson et Langstaff (1) ont faite de la toxine diphtérique précipitée par l'acide acétique, j'ai cru pouvoir calculer, d'après les données des auteurs qui caractérisent leurs toxines par le poids d'azote par unité *Lf*, des chiffres de 25 à 34,8 unités toxiques (*f*) par *milligramme* de protéines. Si la transposition que j'ai dû faire de leur système d'unités dans le mien est exacte, les toxines précipitées par l'acide acétique seraient un peu plus pures que les toxines purifiées par les précipités de phosphates de chaux. Il semblerait par contre qu'elles soient plus profondément altérées, surtout dans leur pouvoir toxique et dans leur stabilité.

J'ai constaté plusieurs fois d'autre part que la floculation, dans le mélange neutre de 100 cent. cubes de toxine diphtérique à 10 ou 11 unités toxiques (*f*) avec la quantité correspondante de sérum, fournissait un dépôt pesant 19 à 20 *milligrammes*. Si la précipitation de la toxine est intégrale (ce qui n'est pas absolument certain), un litre de toxine fournirait environ 0 gr. 200 de floculat, alors que mes toxines purifiées contiennent encore 0 gr. 350 à 0 gr. 400 de protéines (le taux des unités toxiques étant ramené de part et d'autre à environ 10 par centimètre cube). Il resterait encore, pour apprécier la quantité de protéines par litre d'une toxine rigoureusement pure, à déterminer quelle est la part de la toxine et celle du sérum dans les 0 gr. 200 de floculat par litre. L'entreprise n'est peut-être pas irréalisable; nous nous réservons de la tenter.

ESSAIS DE PURIFICATION PLUS COMPLÈTE DE LA TOXINE.

Pourrait-on soumettre la toxine purifiée à une nouvelle adsorption par un précipité de phosphate de chaux, et réussir

(1) Frederick WATSON et Elsie LANGSTAFF. *Biochemical Journal*, 20, 1926, p. 763.

encore à éliminer dans cette opération des protéines étrangères? Ce ne serait possible qu'après la dialyse, car avant qu'on ait dialysé, la solution des phosphates de chaux dans le citrate de soude est instable et l'équilibre est rompu dès qu'on introduit les nouveaux réactifs. D'autre part, je n'ai pas réussi à récupérer des précipités produits dans la toxine dialysée une substance capable de flocculer.

Un autre procédé de purification supplémentaire consisterait à concentrer fortement la toxine purifiée, puis à la soumettre à une nouvelle dialyse. Un essai m'avait donné un résultat intéressant (expérience 49). La toxine purifiée avait été concentrée à 1/10 du volume de la toxine originale, puis dialysée pendant huit heures contre les volumes d'eau distillée habituels. Le nombre d'unités toxiques par *milligramme* de protéines s'était élevé à 28, chiffre le plus élevé que j'aie obtenu; le rendement en toxine était tombé, il est vrai, à 30 p. 100. Dans d'autres expériences, où la toxine purifiée n'avait été concentrée qu'au tiers du volume de la toxine brute, les unités toxiques par *milligramme* ne dépassaient pas 25 à 26. Peut-être y aurait-il lieu de reprendre ces essais; provisoirement, le gain ne m'a pas semblé compenser le temps et le travail dépensés en supplément. La teneur en sels, calculée pour une toxine à 10 unités (*f*), avait été abaissée à 0.628 p. 100 dans une expérience, à 1.250 p. 100 dans une autre.

POUVOIR TOXIQUE DE LA TOXINE PURIFIÉE. RAPPORT AVEC LE POUVOIR FLOCCULANT.

Les toxines préparées en bouillon Martin dans le service de Sérothérapie de l'Institut Pasteur tuent en général le cobaye de 300 à 350 grammes à la dose de 1/700^e à 1/1.000^e de centimètre cube, quand elles viennent d'être filtrées. Les toxines purifiées, ramenées au volume de la toxine originale, mais avec un rendement moyen de 60 p. 100 d'après le titrage par flocculation, tuent en moyenne à 1/300^e de centimètre cube. On peut naturellement obtenir, par concentration dans le vide, des taux bien plus élevés. Une toxine concentrée à 13 unités (*f*) par centimètre cube tuait le cobaye de 300 grammes à 1/600^e en trois jours et à 1/800^e en cinq jours et demi; une

autre, concentrée à 17 unités par centimètre cube, tuait à 1/1.000^e en trois jours et demi et à 1/1.200 en cinq jours. En relevant le chiffre des unités toxiques (*f*) d'une part, et celui des doses mortelles d'autre part, j'ai été frappé du fait qu'il existait entre eux un rapport relativement constant. Une différence de 1/100^e dans le taux de la dilution qui tue correspond souvent à une différence de 2 unités toxiques (*f*). Voici quelques exemples :

| | UNITÉS TOXIQUES (<i>f</i>) par cent. cube | DOSE MORTELLE |
|-------------------------|--|-----------------------|
| Expérience 13 | 8 | 1/300 en 3 jours 1/2. |
| Expérience 44 | 7,5 | 1/300 en 3 jours 1/2. |
| Expérience 54 | 5,7 | 1/300 en 3 jours 1/2. |
| Expérience 56 | 4,4 | 1/200 en 4 jours. |
| Expérience 58 | 6,4 | 1/300 en 2 jours 1/2. |

Les toxines originales, fraîches, sont environ deux fois plus toxiques, pour le même nombre d'unités toxiques (*f*) ; c'est-à-dire qu'à une différence de 1 unité toxique correspond approximativement une différence de 1/100^e dans la dose mortelle : une toxine à 10 unités toxiques (*f*) tue en général à 1/1.000^e de centimètre cube (sans toutefois que le rapport soit rigoureusement constant).

Mais lorsqu'une toxine a été conservée quelque temps, même à la glacière, le rapport change : le pouvoir flocculant ne varie pas, tandis que la toxicité baisse. C'est ainsi qu'une toxine à 9,5 unités, qui tuait à 1/1.000^e en quatre jours le 30 mai, ne tue plus qu'à 1/500^e le 21 novembre (à près cinq mois et demi à la glacière). Pour une différence de 1/100^e dans le chiffre de la dose mortelle, il y a alors une différence de 1,9 unités toxiques, rapport voisin de celui qui est habituel pour la toxine purifiée. J'ai purifié deux toxines, l'une tout à fait fraîche, l'autre vieillie à la glacière, et comparé le rapport des unités (*f*) avec la dose mortelle dans les toxines brutes et purifiées. Il s'est confirmé que, pour la même toxicité, la toxine purifiée contenait environ deux fois plus d'unités (*f*) dans le cas de la toxine fraîche, tandis que le rapport était sensiblement le même dans le cas de la toxine vieillie.

Il y a dans une toxine fraîche une partie labile et une partie stable, au point de vue du pouvoir toxique. Lorsqu'on fixe cette

toxine par adsorption sur un précipité de phosphate de chaux, seule la partie stable conserve son pouvoir toxique.

Cette interprétation est confirmée par le fait que la toxine purifiée est remarquablement stable. La dose mortelle varie très peu, non seulement à la glacière, mais même à la température du laboratoire. Par exemple, une toxine qui tue à $1/300^{\circ}$ en trois jours et demi au moment de sa préparation, tue encore au même titre, et dans le même temps, après avoir séjourné trente-deux jours au laboratoire. Une toxine qui tue le 31 mai à $1/300^{\circ}$ en trois jours et demi et à $1/500^{\circ}$ en six jours et demi, conservée à la glacière, tue au bout de trois mois un cobaye à $1/350^{\circ}$ en quatre jours et demi, avec les lésions caractéristiques, mais n'en tue pas un autre à $1/320^{\circ}$. A la température du laboratoire, cette toxine tuait au bout d'un mois en quatre jours et demi à $1/300^{\circ}$ et en trois jours à $1/200^{\circ}$. Après un mois à l'étuve à 36° , en tube scellé, elle tuait en quarante-huit heures à $1/100^{\circ}$ et en quatre jours et demi à $1/200^{\circ}$.

Quant au pouvoir floculant, il va de soi qu'il reste intact, même après des mois de conservation.

Par contre en solution diluée, à $1/200^{\circ}$ ou $1/300^{\circ}$, la toxicité a fortement diminué au bout d'une huitaine de jours. La dose qui tuait au moment de la dilution ne produit plus qu'une petite eschare.

ANATOXINE PURIFIÉE. IMMUNISATION.

La toxine, transformée en anatoxine par le séjour à l'étuve en présence de formol, peut être purifiée au moyen des précipités phosphatiques, exactement comme une toxine originale.

Dans la crainte, peut-être vaine, que la constitution chimique de l'anatoxine ne soit altérée sous l'action des réactifs avec lesquels elle serait mise en contact au cours de la purification, j'ai cherché de préférence à transformer en anatoxines des toxines déjà débarrassées, dans la mesure du possible, des protéines étrangères et, condition très importante, *amenées au titre de 9 à 10 unités (f) par centimètre cube.*

S'il existait un rapport défini entre le taux des protéines et la quantité de formol à employer pour faire disparaître toute toxicité, il suffirait d'ajouter à la toxine purifiée environ trente

fois moins de formol qu'il n'en faut pour la toxine originale. Par contre, si dans la toxine brute le formol ne se combinait qu'avec les groupements toxiques, la même quantité de formol serait nécessaire pour la toxine purifiée. Ce n'est ni l'une ni l'autre de ces éventualités qui se produit. On sait que pour désintoxiquer les toxines en bouillon Martin il faut en moyenne une concentration de 4 p. 1.000 de formol et un séjour de trente jours à l'étuve à 39°. Or, une toxine purifiée, qui était restée cinquante-deux jours à l'étuve à 37°, additionnée de 0,2 et de 0,5 p. 1.000 de formol, tuait le cobaye à la dose de 1 cent. cube respectivement en trente-six heures et quarante-huit heures. Par contre, avec 1 p. 1.000 et 2 p. 1.000 de formol, la toxicité ne se manifestait plus.

Avec ces doses de formol et cette température, le temps de séjour à l'étuve ne paraît guère pouvoir être abaissé au-dessous de quarante jours. Après trente jours, l'injection sous-cutanée de 5 cent. cubes peut produire un petit épanchement sanguin au lieu d'injection, puis une sorte d'eschare superficielle, sèche, noirâtre au centre et rouge-brun à la périphérie. D'autres fois, il se forme un œdème profond, dont les limites atteignent $4,5 \times 0,5$ centimètres, sans lésions des téguments. Après quarante jours d'étuve, on peut encore observer un léger épaississement des téguments, qui dure trois ou quatre jours; quelquefois de petites taches violacées de la peau, témoins de petites hémorragies capillaires; quelques croûtelles de 1 à 2 millimètres de diamètre; et enfin, au cinquième ou sixième jour, de minuscules indurations, grosses comme une tête d'épingle. Les premières de ces petites lésions paraissent être de véritables réactions, qui ne se produisent pas avec l'anatoxine ordinaire. Si l'on voulait poursuivre ces essais de préparation d'une anatoxine avec de la toxine purifiée, il y aurait lieu de se rapprocher encore des conditions habituelles de transformation de la toxine en anatoxine, soit en augmentant légèrement la quantité de formol, soit en portant la température de l'étuve à 39°. Les minuscules points indurés, qui existaient par exemple chez 3 cobayes sur une série de 24, sont vraisemblablement produits par des traces de phosphate de chaux. Quant aux croûtelles, elles s'observent aussi quelquefois après l'injection d'anatoxine ordinaire; elles paraissent avoir pour première

origine la petite effraction des téguments et la petite hyperémie produites par l'épilage, et plus ou moins accentuées selon les caractères individuels de la peau.

Quant à l'immunité obtenue, 2 cobayes qui avaient reçu 5 cent. cubes, puis 1 cent. cube d'anatoxine purifiée, à dix-huit jours d'intervalle, ont résisté à 80 fois la dose mortelle pour le cobaye de 300 grammes. 1 cobaye, vacciné par 2 injections de 1 cent. cube, a succombé avec 70 fois la dose mortelle. 6 cobayes, vaccinés par 3 injections de 1 cent. cube, aux intervalles convenables, puis éprouvés vingt-quatre jours après la troisième injection, 3 avec 90 doses mortelles et 3 avec 180 doses mortelles, ont tous résisté. Je n'ai pas essayé d'injecter des doses d'épreuve plus élevées, parce que les cobayes dont je disposais ne présentaient, comme cela se voit pour certains lots, qu'une résistance relativement faible : sur 4 animaux vaccinés par 2 injections d'anatoxine ordinaire, 2 avaient succombé après l'injection de 130 doses mortelles, avec les lésions caractéristiques de l'intoxication diphtérique.

Les résultats obtenus sur l'animal m'ont paru autoriser un premier essai de vaccination humaine, dont le D^r G. Loiseau a bien voulu se charger. Dans un groupe de 10 fillettes à réaction de Schick positive, 7 ont reçu les 3 injections normales, 3 n'ont pu recevoir que 2 injections, par suite d'absences au moment des séances de vaccination. La réaction de Schick de contrôle, pratiquée cinq semaines après la dernière injection, a été négative chez les 10 fillettes. Ce n'est là qu'une expérience d'orientation; elle prouve du moins que l'anatoxine purifiée immunise. On a noté un peu d'œdème et de rougeur au point d'inoculation chez plusieurs enfants, et une température de 38°4 deux fois sur les 27 injections pratiquées. L'élimination de la presque totalité des protéines étrangères ne supprime donc pas intégralement les réactions. Il faut évidemment une expérience beaucoup plus étendue pour pouvoir faire une comparaison, au point de vue de la fréquence et de l'intensité, entre ces réactions et celles que provoque l'anatoxine ordinaire.

D'autre part, l'anatoxiréaction, pratiquée chez 4 convalescents de diphtérie, a donné des réactions (rougeur avec légère

élevure centrale) de diamètre environ 4 fois moindre pour l'anatoxine purifiée que pour l'anatoxine ordinaire, inoculée en même temps au même bras.

CONCLUSIONS.

La toxine diphtérique possède la propriété d'être absorbée par les précipités de phosphates dicalcique ou tricalcique à l'état naissant. On peut utiliser cette propriété pour la séparer des protéines étrangères du milieu de culture, en remettant le précipité en solution à l'aide du citrate de soude et de l'acide citrique.

Le meilleur critérium de la pureté d'une toxine est le nombre d'unités toxiques par milligramme de protéines (unités toxiques déterminées par la méthode de floculation).

La composition du précipité de phosphate de chaux a peu d'influence sur le rendement en toxine précipitée et sur le taux des protéines étrangères entraînées. Peut-être le phosphate tricalcique absorbe-t-il un peu plus de toxine et un peu moins de protéines que le phosphate dicalcique. Il est un peu plus facile à redissoudre. Une quantité notable de calcium en excès sur celle qui est nécessaire pour produire du phosphate tricalcique augmente d'environ 10 p. 100 le rendement en toxine; mais l'augmentation de la quantité de protéines étrangères entraînées est encore plus forte, et la toxine récupérée est moins pure.

La manière dont le précipité de phosphates se forme et se propage à travers le liquide est un facteur décisif, et difficile à analyser. Il convient d'introduire le calcium dans la toxine avant la soude, au lieu de suivre l'ordre inverse. Les deux réactifs doivent être ajoutés goutte à goutte, et lentement.

Si l'on fractionne la précipitation, on voit qu'un premier précipité, correspondant à peu près au phosphate contenu dans la toxine brute, entraîne relativement plus de protéines étrangères que de toxine. Il est donc préférable de le rejeter. On recueille ensuite celui qui correspond à une addition de 25 cent. cubes de solution mol/l de phosphate monopotassique par litre. Un précipité plus abondant, obtenu avec une quantité plus forte de solution phosphatique, est de nouveau plus riche en protéines pour la même richesse en toxine.

La dissolution des précipités par additions alternatives de citrate de soude et d'acide citrique donne de meilleurs résultats que la dissolution par emploi combiné du citrate de soude et de l'acide phosphorique. Elle possède un pH voisin de 6,8; après dialyse, on peut ajuster la réaction à pH 7,2 ou 7,4.

Dans la dialyse sur membrane de cellophane, la toxine purifiée, dialysée contre un volume d'eau distillée égal à 8 fois celui de la toxine originale, perd plus de protéines étrangères que de toxine pendant les huit premières heures environ. Entre huit et vingt-quatre heures, les deux éléments passent avec la même vitesse. Au delà de vingt-quatre heures, la perte de toxine n'est plus compensée par l'élimination des protéines. Ainsi le nombre d'unités toxiques par milligramme de protéines augmente, puis reste stationnaire, puis se met à décroître. La dialyse doit être limitée à huit heures, en changeant une fois le liquide extérieur, au bout de deux heures plutôt qu'au bout de quatre heures.

Si l'on injecte sous la peau le produit purifié, le phosphate de calcium se sépare du citrate de soude et forme sur place un dépôt. On prévient cet inconvénient en éliminant le calcium soit avant, soit après la dialyse. Le second procédé donne des résultats un peu supérieurs, mais est plus compliqué et soulève quelques objections de détail.

Les toxines soumises à la purification contenaient en moyenne 9,8 unités toxiques (titrées par floculation) par centimètre cube, 17 *milligr.* 71 de protéines par centimètre cube, et 0,35 unités toxiques par *milligramme* de protéines.

Après purification, le rendement moyen en toxine a été de 57,9 p. 100; le taux des protéines par centimètre cube de 0 *milligr.* 231 et le nombre d'unités toxiques par milligramme de 22,35. Le chiffre extrême d'unités toxiques par milligramme atteint a été de 26,4. L'indice moyen de purification, c'est-à-dire le rapport moyen entre le nombre d'unités toxiques par milligramme dans la toxine originale et la toxine purifiée, a été 40. En ramenant par concentration dans le vide la toxine purifiée au taux initial des unités toxiques par centimètre cube (10 environ), on calcule que 97 à 98 p. 100 des protéines de la toxine brute ont été éliminés.

La solution de toxine purifiée, concentrée à 10 unités,

contient 2 à 3 p. 100 de citrate de soude, et des traces de phosphate et de calcium.

Les toxines purifiées au moyen des précipités de phosphates de chaux contiennent encore 0 gr. 350 à 0 gr. 400 de protéines par litre. Il est possible que le poids de toxine pure ne dépasse pas 0 gr. 100. Peut-être un degré plus parfait de purification serait-il encore atteint en soumettant à une seconde dialyse, après concentration, la toxine purifiée. Dans ces conditions, on est arrivé au chiffre de 28 unités toxiques par milligramme de protéines, mais le rendement en toxine était tombé à 30 p. 100.

La toxine purifiée, ramenée au même nombre d'unités toxiques que la toxine originale, ne tue le cobaye qu'à une dilution environ deux fois moindre. Mais la dose mortelle est voisine de celle que présente la toxine originale après quelques mois de conservation à la glacière. Il y a dans les groupements toxiques d'une toxine fraîche une partie stable et une partie instable; dans la toxine purifiée, la toxicité de la première subsiste seule. Le pouvoir flocculant par contre reste entier.

La toxine purifiée se transforme en anatoxine, quand elle a séjourné environ quarante jours à 37°, après addition de 2 p. 1.000 de formol. Cette anatoxine purifiée, d'après quelques expériences d'orientation, immunise convenablement, mais peut provoquer de légères réactions locales et générales.

**SUR LES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES
DU BACILLE PARATUBERCULEUX DE LA FLÉOLE
PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES, ANTIGÈNES ET ALLERGISANTES.**

par EUGÉNIE ALEXA.

*(Travail du Laboratoire du professeur Calmette,
Institut Pasteur.)*

A. — PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES.

A la suite de l'inoculation du bacille de la fléole, Moeller a signalé, chez le cobaye, la présence de granulations péritonéales et même pulmonaires, avec caséification et cellules géantes typiques.

Lubarsh, injectant directement ces bacilles dans les reins ou dans les veines, a obtenu des tubercules caséifiés, avec des cellules géantes typiques qui contenaient souvent des formes massuées actinomycosiques.

Mayer signale également que le bacille de la fléole, injecté dans la cavité péritonéale du cobaye, provoque le développement de tubercules caséifiés, contenant des cellules géantes.

Hölsher en étudiant les effets pathogènes du même germe affirme n'avoir observé ni caséification, ni extension des lésions, ni forme actinomycosique des éléments microbiens, consécutivement à l'inoculation intrapéritonéale. Par inoculation intraveineuse, il a obtenu des granulations se rapprochant beaucoup des tubercules dus à des corps étrangers.

Schulze a inoculé le bacille de la fléole dans le rein des lapins; au bout de treize jours il a trouvé dans cet organe des bacilles présentant des formes rayonnées avec massues et crosses rappelant l'aspect de l'actinomycose. Ces faits ont été récemment confirmés par H. Limousin.

Weber, puis Bulloch n'ont jamais réussi, avec le bacille de la fléole, à obtenir des lésions extensives amenant la mort et identiques aux lésions de la tuberculose.

Rodet et Galavielle se sont adressés à la voie veineuse chez le cobaye et le lapin; avec des doses fortes de bacilles de la fléole ils provoquent tantôt la mort de l'animal, tantôt une maladie passagère. D'après ces auteurs, l'organe le plus gravement atteint est le rein qui renferme des nodules tuberculiformes dans la corticale et la médullaire. Dans le poumon, ils ont trouvé des granulations ressemblant aux granulations grises dues au bacille de Koch. Inoculé sous la peau, le bacille provoque un abcès qui se vide et se répare très rarement. Les injections sous-cutanées et intraveineuses, pratiquées chez les bovidés et la chèvre, ont donné les mêmes résultats.

Calmette et Guérin ont trouvé des lésions d'adénopathie mésentérique chez des jeunes chevreaux nourris par des mères artificiellement infectées dans les mamelles avec le bacille de la fléole. La réaction défensive des ganglions est suffisamment efficace pour empêcher les microbes de franchir cette barrière.

Chez le chien, Courmont et Descos ont obtenu des lésions tuberculiformes.

Potet est arrivé aux mêmes résultats. Le bacille, inoculé par la voie sous-cutanée, produit un abcès local; par la voie péritonéale, une péritonite exsudative et des lésions péritonéales prenant en certains endroits l'aspect de nodules.

Bezançon et Philibert ont obtenu, en injectant les bacilles de la fléole dans le péritoine des cobayes, des lésions de péritonite, des adhérences fibreuses péri-spléniques et péri-hépatiques.

Courmont et Potet ont reproduit avec le bacille de la fléole des lésions ayant les caractères essentiels des tubercules dus au bacille de Koch.

Cantacuzène provoque une infection aiguë, mortelle en vingt-quatre heures, en injectant de fortes doses de ces microbes à des cobayes jeunes (demi-culture sur gélose) dans le péritoine. La dose non mortelle provoque une péritonite chronique accompagnée de troubles généraux. La résorption complète des bacilles et la guérison des lésions locales s'effectuent en six semaines. L'auteur donne une description détaillée du processus

infectieux qui se caractérise par *a*) la persistance très longue du stade à polynucléaires; *b*) l'absence de nécrose chez ces éléments.

Les conclusions de ces différents auteurs, relativement aux propriétés pathogènes des bacilles paratuberculeux, sont assez divergentes. Néanmoins, tous sont d'accord pour reconnaître que l'inoculation sous-cutanée et péritonéale de ces microbes provoque un abcès local assez semblable à un abcès tuberculeux. Il n'en est pas de même en ce qui concerne la dissémination des lésions à la suite des inoculations. Certains observent que les viscères restent sains, d'autres les trouvent criblés de tubercules, comme si la lésion locale avait évolué vers une généralisation. Par contre, les résultats obtenus par voie intraveineuse paraissent plus réguliers et tous les expérimentateurs ont remarqué que, lorsque les doses injectées sont suffisantes, des tubercules caséux ou non apparaissent dans les différents organes. Comme les expériences rappelées ci-dessus ont été poursuivies dans des conditions variables (âge des cultures, doses, animal, voie d'inoculation) nous avons, sur le conseil de M. le professeur Calmette, repris l'étude de l'infection expérimentale des petits animaux de laboratoire par le bacille de la fléole, ce germe étant un de ceux qui se montrent le plus nettement doués d'un pouvoir pathogène, et nous avons suivi l'évolution des lésions jusqu'à leur disparition ou leur guérison complète.

Dans ce dessein nous avons inoculé un grand nombre d'animaux : lapins et cobayes, par la voie intraveineuse. A titre de contrôle, nous avons injecté des cobayes et des lapins par la voie sous-cutanée et péritonéale avec de fortes doses allant jusqu'à 250 milligrammes de bacilles de la fléole. Les animaux inoculés par la voie péritonéale, même avec 250 milligrammes, présentaient des lésions de péritonite chronique d'aspect caséux, qui, à la coupe, montraient des tubercules centrés par un amas microbien et entourés de cellules épithélioïdes, puis de lymphocytes. L'envahissement de ces masses par les polynucléaires était fréquent.

En aucun cas, nous n'avons trouvé de lésions macroscopiques, en dehors du point d'inoculation : tous les viscères examinés étaient sains. Les inoculations sous-cutanées n'ont

jamais donné lieu à une infection généralisée, les viscères étaient toujours indemnes, exception faite des lésions pulmonaires ou hépatiques dues à des microbes banaux « microbes de sortie ».

Etude histologique des lésions
observées chez les cobayes et les lapins
à la suite d'injections intraveineuses massives
des bacilles de la fléole.

Des doses de 30 milligrammes et 100 milligrammes de bacilles de la fléole, émulsionnés dans l'eau physiologique, ont été injectées par la voie veineuse à des cobayes et des lapins. Ces animaux, qui avaient d'ailleurs très bien supporté une telle dose, ont été inoculés dans des conditions précises, et sacrifiés à des dates régulières afin d'étudier sur pièces, correctement fixées, les diverses modifications dues à la présence du bacille de la fléole dans l'organisme.

Voici en résumé le résultat de nos observations :

COBAYES.

POUMON. — Chez les animaux, morts *trente à quarante-huit heures* après l'inoculation, vraisemblablement du fait d'une septicémie banale, on trouve un poumon très congestionné; certaines bronches renferment des polynucléaires, un certain nombre de foyers d'alvéolite sont également remarqués, le contenu des alvéoles étant surtout constitué par de grands mononucléaires et des polynucléaires. Ces petits foyers broncho-pneumoniques à localisation juxta-bronchique ne rappellent pas la broncho-pneumonie tuberculeuse; ils n'ont rien de spécifique et sont sans doute causés par des microbes de sortie.

Au bout de *cinq jours*, on trouve dans le poumon une assez grande quantité de pigment noir uniformément réparti dans la trame. Il existe quelques tubercules parfaitement constitués et délimités. Ces tubercules sont surtout formés de mononucléaires et de lymphocytes avec, au centre, un amas microbien de forme plus ou moins régulière, coloré en rouge par l'éosine.

Il n'y a pas de cellules géantes, peu de cellules épithélioïdes. Autour des tubercules organisés, on note une assez grande quantité d'éosinophiles, de mono et de polynucléaires.

Le *septième jour*, le poumon contient de nombreux tubercules constitués, du centre à la périphérie, par une masse microbienne autour de laquelle on trouve des cellules épithélioïdes et quelques lymphocytes. Plusieurs de ces tubercules sont envahis par des polynucléaires; l'infiltration polynucléaire paraît d'ailleurs prédominer au centre du tubercule. Il s'agit de tubercules en voie de suppuration. Il existe également du pigment ferrique. Un certain nombre de vaisseaux sont entourés d'un manchon inflammatoire. Ça et là apparaissent des foyers hémorragiques.

Dix jours après l'inoculation, des tubercules sont infiltrés de polynucléaires qui gagnent du centre vers la périphérie et tendent à transformer les tubercules en abcès. On note quelques cavités rondes à paroi fibreuse qui représentent certainement des tubercules vides (cavernes) qui se sont évacués par voie bronchique. On remarque quelques amas leucocytaires juxta-vasculaires et quelques petits foyers de broncho-pneumonie banale.

Le *treizième jour*, rien n'est modifié dans l'aspect des tubercules si ce n'est, à la périphérie de certains d'entre eux, l'amorce d'une réaction fibreuse. Il existe toujours dans la trame une assez grande quantité de pigment.

Le *quinzième jour*, on note dans les poumons des petits foyers leucocytaires, avec prédominance de lymphocytes. Dans le parenchyme pulmonaire on trouve des petits tubercules, arrondis, organisés; à la périphérie une sclérose jeune s'ébauche. Ces tubercules sont semblables à ceux que provoque le bacille de Koch, mais il n'existe pas de caséum au centre.

Vingt jours après l'inoculation, le poumon contient de nombreux tubercules typiques. De la périphérie au centre, on rencontre une zone scléreuse, parfois extrêmement marquée, des lymphocytes, des cellules épithélioïdes, parmi lesquelles sont semées des cellules géantes de dimensions variées, les unes contenant huit à dix noyaux. Au centre, on trouve des amas de bacilles de la fièvre ayant pris fortement l'éosine. Certains tubercules sont envahis par la suppuration. Cette tendance à la

suppuration paraît particulière à l'infection par le bacille de la fiéole et ne se rencontre pas dans la tuberculose.

Trente jours après l'inoculation, on remarque plusieurs tubercules de très grandes dimensions, entourés d'une coque fibreuse, épaisse, diffuse, la sclérose s'étendant assez loin. Les tubercules contiennent, au centre, des cellules épithélioïdes, des cellules géantes, un amas homogène éosinophile et une grosse masse bacillaire ; à la périphérie, on remarque une réaction fibreuse très importante. Ces tubercules ne sont pas caséux, mais plusieurs d'entre eux sont nécrosés au centre.

Le *quarante-cinquième jour*, certains tubercules ne sont plus constitués que par 4 ou 5 cellules géantes dans un bloc fibreux parfaitement organisé. Dans d'autres, au contraire, il existe encore des masses microbiennes autour desquelles se trouvent des polynucléaires, et le tout est encerclé par du tissu conjonctif jeune. On note une grande quantité de pigment ferrique. Il existe, en outre, quelques petits foyers broncho-pneumoniques dans lesquels abondent des polynucléaires. On ne trouve pas, dans cette zone, de bacilles de la fiéole. Ces lésions broncho-pneumoniques sont sans doute le fait d'un germe banal (microbe de sortie).

Soixante jours après l'inoculation, le poumon contient de rares placards fibreux, reliquats de tubercules, et quelques tubercules à enveloppe fibreuse, au milieu desquels on observe un amas microbien très bien coloré par l'éosine et entouré par des cellules épithélioïdes.

*
* *

Ce qui frappe dans ce processus, c'est la réaction congestive des poumons s'accompagnant même de foyers hémorragiques, d'où la formation d'une assez grande quantité de pigment ferrique qu'on retrouve dès les premiers jours après l'inoculation. La formation des tubercules demande environ cinq jours ; ces tubercules ressemblent à ceux que produit le bacille de Koch, mais ils renferment au centre des amas de bacilles de la fiéole affectant des formes diverses. Aucun de ces tubercules ne devient caséux, ils se distinguent des lésions tuberculeuses vraies par leur tendance à la suppuration ; celle-ci paraît

débuter au voisinage des amas bacillaires. La réaction scléreuse intense se développe surtout du vingtième au trentième jour; elle constitue le processus de guérison le plus ordinaire. En divers points cependant, les abcès se vident par les bronches. Au soixantième jour, si une grande partie des tubercules s'est transformée en bloc fibreux, certains d'entre eux ressemblent encore à des tubercules vrais; leur centre contient des bacilles de la fiéole.

*
* *

REIN. — *Trente à quarante-huit heures* après l'inoculation, le rein est le siège d'une congestion intense. Il existe même des petits foyers hémorragiques. Dans certains groupes de *tubuli contorti*, l'épithélium rénal est chargé de pigment noir rappelant tout à fait le pigment ferrique (élimination de pigment comme dans les reins paludiques). Des grains plus fins sont également visibles dans certains glomérules de *Malpighi*.

Cinq jours après l'inoculation, il reste encore dans la zone des *tubuli contorti* quelques masses pigmentaires. On note, dans la médullaire rénale, 2 ou 3 foyers leucocytaires assez mal délimités. Ces amas leucocytaires sont constitués par des grands mononucléaires et des polynucléaires.

Sept jours après, on note des tubercules avec réaction scléreuse jeune à la périphérie. Au centre de ces tubercules on aperçoit l'amas microbien, entouré de cellules épithélioïdes et de mononucléaires; certains de ces tubercules sont envahis par des polynucléaires.

A partir du dixième jour on remarque, dans la médullaire et dans la corticale, plusieurs petits abcès bien délimités, ovulaires. Dans les tubes urinifères, des polynucléaires plus ou moins altérés forment des amas.

Le treizième jour, on trouve encore des tubercules disséminés dans les reins; dans le tissu adipeux péri-rénal, il existe également des tubercules typiques, parfois infiltrés par des polynucléaires. Le bassin et certains tubes urinifères sont remplis de pus. Une réaction scléreuse jeune assez importante s'organise entre les tubes.

Le quinzième jour, on note de même dans la médullaire rénale des petits abcès entourés d'une zone scléreuse jeune,

délimitant une véritable coque. A côté de ces abcès parfaitement délimités par cette zone scléreuse, on en trouve d'autres, constitués seulement par une infiltration de leucocytes, grands mononucléaires et lymphocytes, donnant lieu sur place à une sclérose jeune diffuse.

Le vingtième jour, la plupart des tubercules offrent exactement l'aspect des tubercules vrais. De la périphérie au centre, on rencontre une zone scléreuse, parfois extrêmement marquée, des lymphocytes, des cellules épithélioïdes parmi lesquelles sont semées des cellules géantes de dimensions variées. Certains tubercules paraissent envahis par un début de suppuration. Infiltration assez importante des tubes. Entre les tubes, zone fibreuse.

Après trente jours, forte réaction fibreuse. On remarque un certain nombre de nodules formés de cellules épithélioïdes. Certains de ces nodules sont en voie de suppuration (pas de caséum), d'autres sont entourés d'une zone fibreuse, s'étendant assez loin en dissociant les tubes urinifères.

Quarante-cinq jours après, on observe des foyers scléreux non encore parfaitement organisés, dissociant les *tubuli*. On trouve également, au milieu des placards fibreux, quelques tubercules constitués par des cellules épithélioïdes avec la masse microbienne au centre.

Le soixantième jour, on note des placards fibreux adultes et, en outre, quelques tubercules contenant encore des amas microbiens et des cellules épithélioïdes.

*
* *

En résumé, dans les quarante-huit premières heures après l'injection de 30 milligrammes de bacilles dans la veine on observe, dans le rein, une congestion intense, des foyers hémorragiques et, comme conséquence, une surcharge pigmentaire très importante des cellules des *tubuli contorti*. Ce pigment disparaît peu à peu, et, sauf de rares exceptions, on n'en trouve plus quinze jours après l'inoculation. Les tubercules s'organisent entre le cinquième et septième jour; aucun n'évolue vers la caséification; mais la plupart sont envahis par des polynucléaires, deviennent purulents et s'évacuent par les *tubuli*

voisins. Les amas microbiens, au centre des tubercules, persistent plus de deux mois, mais au bout de ce laps de temps la plus grande partie des tubercules n'existe plus; ils sont remplacés par des placards fibreux, siégeant dans la médullaire et la corticale.

FOIE. — Le foie ne présente à aucun moment de lésions du type tuberculeux. Dans les premières heures après l'inoculation se produit une congestion très marquée; il existe même des petits foyers hémorragiques. Mais vers le cinquième jour on voit apparaître une dégénérescence grasseuse tout à fait analogue à celle qu'on observe dans le foie d'individus morts de tuberculose. Cette dégénérescence grasseuse atteint son maximum entre le dixième et le quinzième jour, elle décroît entre le vingtième et le trentième jour pour disparaître ensuite.

RATE. — Au niveau de la rate, on observe, à la suite de l'inoculation de bacilles de la fléole, une congestion très vive et des foyers hémorragiques. Il n'existe que très rarement des tubercules; ceux que nous avons trouvés ne contenaient pas au centre d'amas microbien.

CONCLUSIONS.

En résumé, l'infection du cobaye par la voie veineuse avec 30 milligrammes de bacilles de la fléole amène la formation, dans le poumon, le rein et exceptionnellement la rate, de tubercules dont le centre est occupé par un amas microbien. Ces tubercules rappellent dans bien des cas les tubercules obtenus avec le bacille de Koch; mais ils ne deviennent jamais caséeux et sont presque toujours le siège d'une transformation purulente, tout à fait particulière, et que je n'ai jamais observée chez les animaux inoculés avec des bacilles tuberculeux. Ils s'accompagnent d'une réaction scléreuse s'étendant assez loin et qui, lorsque l'amas microbien et les dernières cellules géantes auront disparu, sera le seul vestige de l'infection par le bacille de la fléole. Le bacille détermine, au niveau du foie, une dégénérescence grasseuse intense mais passagère, rappelant celle qu'on observe dans le foie des tuberculeux humains.

La granulie curable que provoque l'injection endo-veineuse de bacilles de la fléole ne ressemble en rien à la granulie curable obtenue par l'injection endo-veineuse de BCG. Si le BCG donne lieu à une éruption de follicules dans le poumon, le rein reste toujours indemne; par contre, le foie contient de nombreuses formations folliculaires, alors que dans l'infection par le bacille de la fléole il n'en renferme pas. D'autre part, la régression des lésions obtenues par le BCG se fait vers la restitution *ad integrum*; il n'y a pas une travée scléreuse ni dans le poumon, ni dans le foie, qui témoigne de la granulie antérieure. Au contraire, l'infection par le bacille de la fléole laisse dans le poumon et le rein des cicatrices fibreuses d'importance variable mais toujours très nettes.

Nous avons été frappé de l'irrégularité des résultats de nos inoculations chez les lapins; alors que les lésions du rein sont les plus constantes, les lésions pulmonaires, au contraire, apparaissent tantôt importantes, tantôt discrètes, tantôt nulles.

Quelles que soient les doses employées (jusqu'à 100 milligrammes en injection intraveineuse), nous n'avons pu obtenir la mort des animaux. Ceux que nous avons perdus au cours de nos expériences sont morts de pasteurellose ou de bronchopneumonie banale si fréquentes après les injections expérimentales de fortes quantités de germes divers. Nous pensons que la mortalité attribuée par de nombreux auteurs au bacille de la fléole est due, en réalité, à ces microbes de sortie.

B. — PROPRIÉTÉS ANTIGÈNES

Propriétés antigènes spécifiques et para-spécifiques
des extraits méthyliques du bacille de la fléole
et de divers bacilles paratuberculeux.

a) PROPRIÉTÉS ANTIGÈNES *in vitro*.

A. Boquet et L. Nègre, utilisant un sérum antituberculeux de cheval, ont mis en évidence des différences importantes entre les extraits méthyliques des divers types de bacilles tuberculeux virulents et avirulents, de bacilles paratuberculeux et de divers

microbes. Ils ont constaté que les extraits de bacilles humains et de bacilles bovins présentent une activité à peu près égale; les extraits de bacilles aviaires et de bacilles pisciaires sont moins actifs; quant aux extraits de bacilles paratuberculeux (Korn et Grassberger), ils ont un pouvoir antigène inférieur aux extraits correspondants de bacilles aviaires et pisciaires. Les extraits méthyliques de bacilles paratuberculeux (fléole) présentent, d'après Valtis, vis-à-vis de sérums de malades tuberculeux, un pouvoir antigène comparable au point de vue qualitatif à celui des antigènes tuberculeux mais quantitativement plus faible. Pour Urbain également, les bacilles paratuberculeux, cultivés dans le milieu à l'œuf de Besredka, constituent des antigènes beaucoup moins actifs que les bacilles tuberculeux humains et bovins. Ces observations concordantes nous ont incitée à étudier comparativement la valeur antigène *in vitro* des extraits méthyliques de quelques bacilles paratuberculeux : bacilles de la fléole, de Grassberger, *Grassbacillus* et bacille de Preisz.

Ces extraits ont été préparés d'après la technique indiquée par A. Boquet et L. Nègre pour la préparation des antigènes tuberculeux.

Des cultures sur bouillon glycérimé, âgées de trois semaines, sont stérilisées par un chauffage de trente minutes à 120° et filtrées sur papier. Les corps bacillaires sont ensuite lavés sur le filtre avec de l'eau distillée puis desséchés à l'étuve. Les microbes secs, réduits en poudre, sont traités par de l'acétone pendant quarante-huit heures (1 cent. cube d'acétone par centigramme de bacilles). Puis ils sont séparés de l'acétone par filtration et mis à macérer dans l'alcool méthylique absolu (1 cent. cube d'alcool par centigramme de bacilles). On laisse en contact pendant dix à douze jours à 37-38° en agitant fréquemment. Le liquide séparé par filtration du dépôt microbien constitue l'antigène méthylique.

Au moment de l'emploi, l'antigène est rendu limpide par un séjour de quelques minutes à l'étuve ou au bain-marie à 50° et on ajoute de l'eau physiologique goutte à goutte, puis plus rapidement dans la proportion de 19 cent. cubes d'eau pour 1 cent. cube d'antigène.

Le titrage des antigènes a été effectué, suivant la méthode de Calmette et Massol, avec des doses croissantes de ces produits

dilués au 1/100 (de 0 c. c. 1 jusqu'à 1 cent. cube) en présence d'une dose fixe d'alexine diluée au 1/15 et d'une dose fixe d'un sérum antituberculeux de cheval contenant 150 unités d'anticorps par centimètre cube. Leur valeur est exprimée en nombre d'unités d'alexine d'après le rapport :

$$\frac{N}{V} : \frac{\text{Nombre de doses minima d'alexine fixées}}{\text{Volume d'antigène}}.$$

Ces titrages comparatifs nous ont permis de constater que :

1° L'extrait méthylique de bacilles de Grassberger, germes dont l'acido-résistance est très affaiblie, possède un pouvoir antigène (1.000 unités) inférieur aux extraits des autres bacilles paratuberculeux.

2° Les extraits méthyliques de bacilles de la fléole, de bacilles de Grassberger et de bacilles de Preisz présentent une activité égale (2.000 unités). Mais leur pouvoir antigène se montre inférieur à celui des extraits méthyliques de bacilles de Koch, dont le titre atteint 3.000 unités.

b) PROPRIÉTÉS ANTIGÈNES *in vivo*.

Nous avons étudié l'évolution des anticorps chez le lapin, depuis le moment où ils apparaissent dans le sérum après l'infection expérimentale, jusqu'à leur disparition.

Dix lapins dont le sérum ne fixait pas l'alexine en présence de l'antigène bacille de la fléole et de l'antigène tuberculeux ont reçu par la voie veineuse 100 milligrammes de bacilles de la fléole en suspension homogène dans 5 cent. cubes d'eau physiologique. Ces animaux ont été ensuite saignés tous les quinze jours jusqu'au quatre-vingt-dixième jour, à des temps variables après l'inoculation : le lapin qui a été saigné pour la première fois quatre jours après l'inoculation a subi la deuxième saignée quinze jours plus tard, c'est-à-dire le dix-neuvième jour; un autre, saigné pour la première fois cinq jours après l'inoculation, a subi la deuxième saignée quinze jours plus tard, c'est-à-dire le vingtième jour. Ces saignées successives, à un intervalle fixe de quinze jours, nous ont permis de suivre la courbe de chaque sérum, de quinze en quinze jours

et, en même temps, de préciser l'évolution des anticorps dans ce groupe d'animaux.

Nous avons, comme pour le titrage de l'antigène, utilisé la technique de Calmette-Massol avec l'extrait méthylique du bacille de la fièvre. Au cours des saignées successives, ces anticorps ayant considérablement augmenté, nous avons employé une dose de 0 c. c. 1 de chaque sérum dilué à 1 p. 4 dans l'eau physiologique, pour revenir à la dose de 0 c. c. 2 de sérum pur, lors des dernières saignées.

ÉVOLUTION DES ANTICORPS CHEZ LE LAPIN. — Toutes les réactions de fixation sont restées négatives avec les sérums récoltés les quatrième, cinquième et sixième jours après l'inoculation bacillaire. Avec le sérum du septième jour, nous avons observé une réaction faiblement positive (fixation d'une dose d'alexine, déduction faite de la dose d'alexine fixée par le sérum seul). À partir du septième jour, les réactions ont été constamment positives; les résultats des titrages de ces sérums, exprimés en unités, sont exposés dans le tableau ci-joint.

Entre le septième et le quatorzième jour, en général, les sérums sont pauvres en anticorps. D'autre part, il existe des différences individuelles importantes dans la faculté de produire les anticorps chez les divers animaux : ainsi, à côté du sérum n° 61 titrant 40 unités le huitième jour, on voit le sérum n° 66 titrant 10 unités seulement le onzième jour. Au cours des saignées ultérieures, ces différences individuelles s'accuseront davantage.

Deuxième saignée. — Cette saignée a été pratiquée entre le dix-neuvième et le vingt-huitième jour après l'inoculation. Ce qui caractérise les résultats des titrages, c'est l'ascension brusque du taux des anticorps. Sauf les sérums n°s 62 et 67 qui resteront jusqu'à la fin très pauvres, on voit le titre du sérum n° 59 monter de 10 à 500 unités, celui du sérum n° 65 de 50 à 650 unités, celui du sérum n° 54, de 80 à 650 unités, etc.

Troisième saignée. — Cette saignée a été pratiquée entre le trente-quatrième et le quarante-troisième jour après l'inoculation. Les sérums qui ont acquis rapidement leur maximum d'anticorps commencent à diminuer d'activité. Ceux des lapins n°s 64 et 65 par exemple, qui le vingt-huitième et le vingt-

cinquième jour titraient 650 unités, n'en contiennent plus que 350.

Quatrième saignée. — Pratiquée entre le cinquantième et le soixante-quatrième jour. La baisse des anticorps s'accroît. La plupart des sérums contiennent environ 50 unités. En étudiant la courbe on remarque que, si l'ascension s'est effectuée d'un seul bond, l'abaissement s'est produit tout aussi brusquement, mais en deux étapes.

50 ————— 650 ————— 350 ————— 50.

Cinquième, sixième et septième saignées. — A partir du soixante-cinquième jour après l'inoculation, les sérums restent très pauvres en anticorps et titrent toujours moins de 50 unités; ainsi les sérums provenant de la cinquième saignée, qui a été pratiquée entre le soixante-cinquième et le soixante-treizième jour, titrent 40 et 10 unités. Des sérums, récoltés entre le soixante-dix-neuvième et quatre-vingt-huitième jour après l'inoculation (sixième saignée), un seul a titré 20 unités, tandis que les autres ont donné une réaction de fixation négative. La septième saignée a été pratiquée sur un seul lapin le cent-treizième jour; la réaction de fixation a été négative.

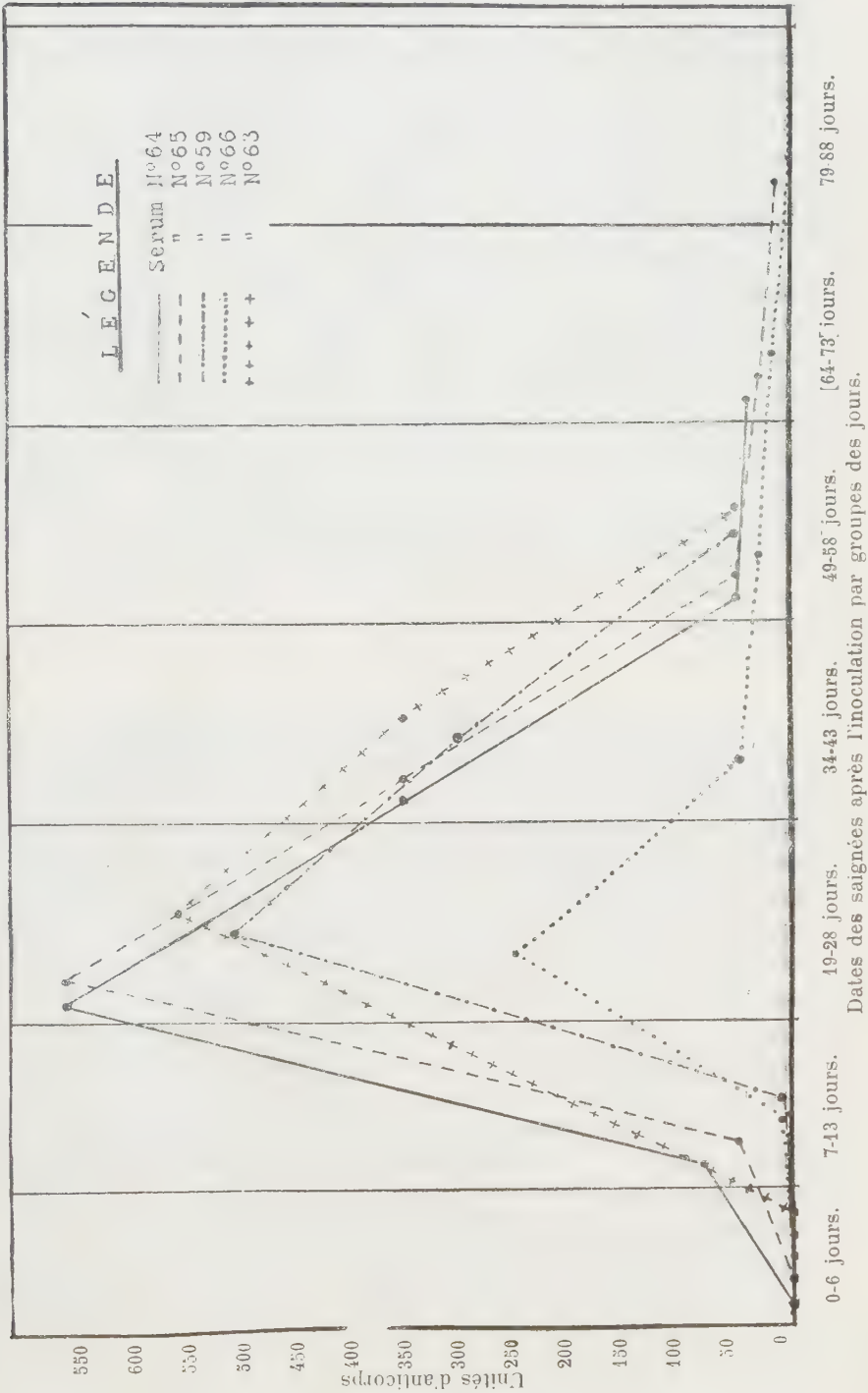
Il se dégage de ces faits que si la diminution des anticorps s'opère rapidement entre la deuxième et la quatrième saignée (650-50 unités, dix-neuvième-soixante-quatrième jour) leur baisse se poursuit ensuite lentement jusqu'à leur disparition totale qui s'opère vers le quatre-vingt-dixième jour. A partir de ce moment, le sérum des animaux préparés par une inoculation de bacilles de la fléole se comporte comme le sérum des animaux normaux dans la déviation du complément en présence de l'antigène spécifique.

ÉVOLUTION DES ANTICORPS CHEZ LES COBAYES. — Bien que les cobayes soient en général de mauvais producteurs d'anticorps, nous avons essayé de titrer, chez quelques animaux de cette espèce inoculés avec le bacille de la fléole, les sensibilisatrices spécifiques de leur sérum. Ces animaux avaient reçu des doses variées de bacilles par voie veineuse et péritonéale. Les réactions ont été effectuées le sixième et le huitième jour après l'inocu-

Évolution des anticorps titrés avec l'antigène homologue chez les lapins inoculés avec des bacilles de la fièvre.

| NUMÉRO DU LAPIN | PREMIÈRE SAIGNÉE pratiquée entre le 4 ^e et le 13 ^e jour après l'inoculation | DEUXIÈME SAIGNÉE entre le 19 ^e et le 28 ^e jour après l'inoculation | TROISIÈME SAIGNÉE entre le 34 ^e et le 43 ^e jour | QUATRIÈME SAIGNÉE entre le 49 ^e et le 58 ^e jour | CINQUIÈME SAIGNÉE entre le 64 ^e et le 73 ^e jour | SIXIÈME SAIGNÉE entre le 79 ^e et le 88 ^e jour | SEPTIÈME SAIGNÉE le 113 ^e jour | OBSERVATIONS |
|-----------------|--|--|--|--|--|--|--|--------------|
| 64 | 80 unités. | + 650 unités. | 350 unités. | 50 unités. | 40 unités. | | | |
| 65 | 50 unités. | 650 unités. | 350 unités. | 50 unités. | 40 unités. | 20 unités. | Négative. | |
| 66 | 10 unités. | 250 unités. | 50 unités. | 40 unités. | 40 unités. | Négative. | | |
| 67 | 50 unités. | 20 unités. | 40 unités. | 40 unités. | 40 unités. | Négative. | | |
| 59 | 10 unités. | 500 unités. | 300 unités. | 50 unités. | | | | |
| 63 | Négative (le 4 ^e jour). | 550 unités. | 350 unités. | 50 unités. | | | | |
| 52 | 10 unités. | 300 unités. | 50 unités. | | | | | |
| 62 | Négative (le 5 ^e jour). | 30 unités. | 40 unités. | | | | | |
| 60 | Négative (le 6 ^e jour). | | | | | | | |
| 61 | 40 unités. | | | | | | | |

Graphique représentant l'évolution des anticorps chez cinq lapins inoculés avec des bacilles de la fléole.



lation, en présence de l'antigène tuberculeux et de l'antigène fléole. Ces expériences nous ont montré que la sensibilisatrice apparaît dans le sérum plus précocement chez les cobayes inoculés par voie circulatoire que chez les cobayes inoculés par voie péritonéale : le huitième jour, elle fait défaut dans le sérum des animaux inoculés par voie péritonéale avec de grandes quantités de germes.

En ce qui concerne les animaux inoculés par la voie circulatoire, le sérum de ceux qui ont reçu des doses fortes (40 milligrammes) contient la sensibilisatrice le sixième jour, tandis que ceux qui ont reçu 20 et 30 milligrammes de bacilles n'en contiennent pas le sixième jour. Le huitième jour, la sensibilisatrice est présente même dans le sérum des cobayes qui n'ont reçu que 10 milligrammes par voie circulatoire; le sérum de ces cobayes fixe en même temps l'alexine et d'une manière plus intense en présence de l'antigène tuberculeux.

Une épizootie qui a décimé nos animaux nous a empêchée de poursuivre ces recherches jusqu'à la disparition complète des anticorps.

SPÉCIFICITÉ DES ANTICORPS.

Nous avons suivi l'évolution des anticorps de trois sérums de lapin antibacilles de la fléole, en présence de l'antigène tuberculeux et de trois autres antigènes paratuberculeux, pour nous rendre compte d'abord s'ils fixent l'alexine avec un antigène autre que celui avec lequel les animaux ont été préparés; ensuite, si les courbes obtenues dans ces titrages comparatifs sont superposables. Les réactions ont été faites avec le sérum provenant de 3 lapins qui avaient reçu 100 milligrammes de bacilles de la fléole par la voie veineuse et saignés pour la première fois entre le quatrième et le treizième jour, puis, plusieurs fois, avec un intervalle de quinze jours. Voici ce que nous avons constaté :

1° Les sérums antibacilles de la fléole ont la propriété de fixer l'alexine, non seulement en présence de l'antigène correspondant, mais aussi avec l'antigène tuberculeux et les antigènes d'autres bacilles paratuberculeux. Les anticorps paratuberculeux ne sont donc pas rigoureusement spécifiques.

2° Les courbes d'évolution des anticorps obtenus avec ces

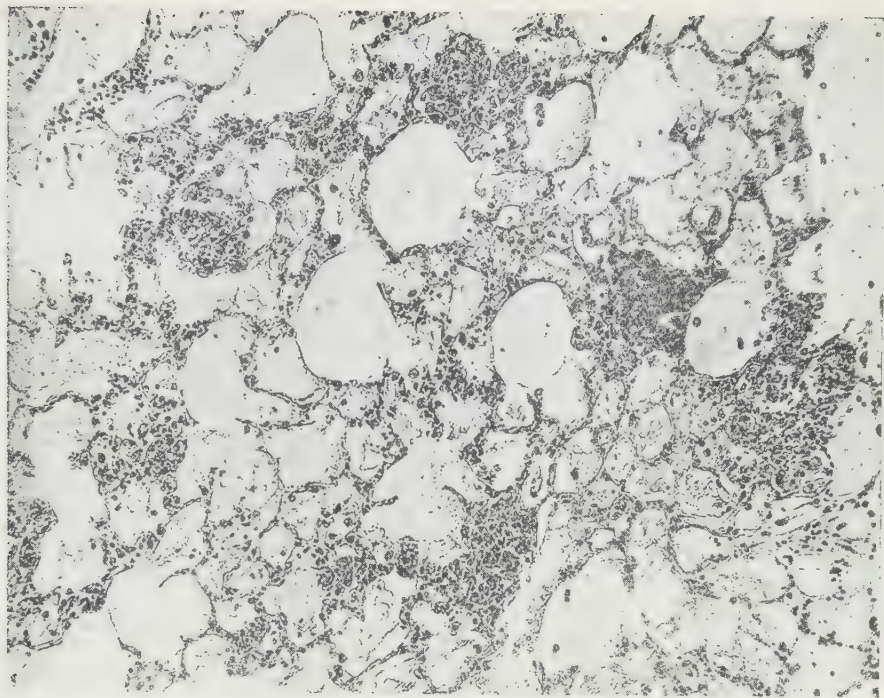


FIG. 1. — Aspect du poumon (lapin) quarante-huit heures après l'injection intraveineuse de 100 milligrammes de bacilles de la fléole. *Granulie*. Grossissement : 100 diamètres.

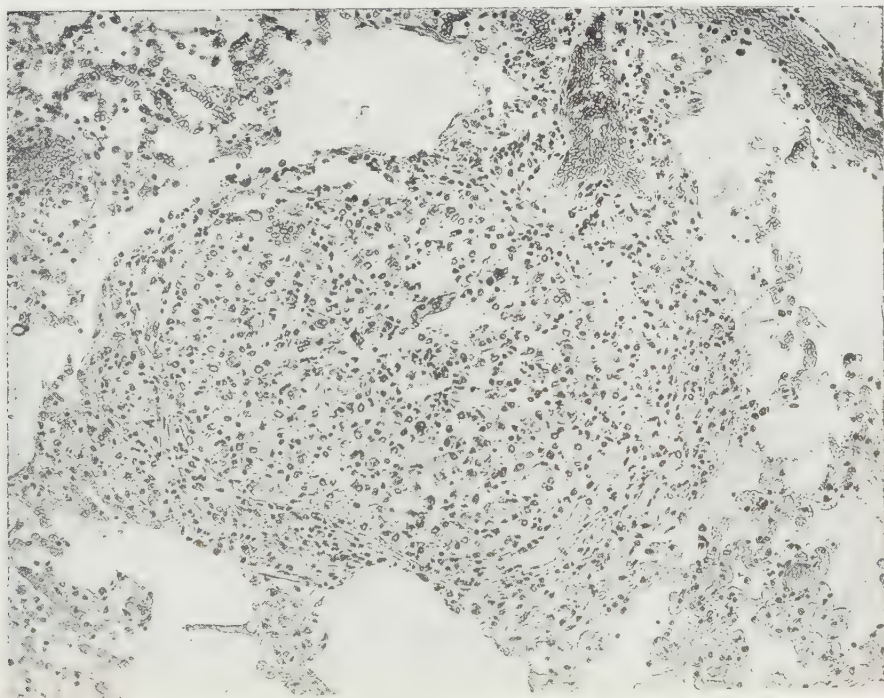


FIG. 2. — Aspect du poumon (cobaye) vingt jours après l'injection intraveineuse de 30 milligrammes de bacilles de la fléole. *Tubercule pulmonaire*; présence de cellules épithélioïdes et de cellules géantes. Grossissement : 150 diamètres.

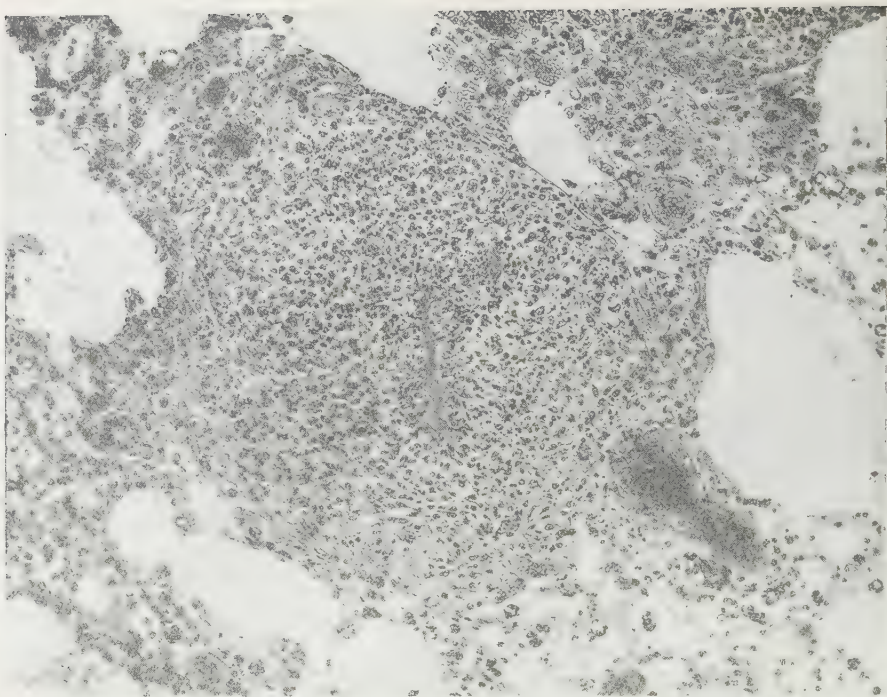


FIG. 3. — Aspect du poumon (cobaye) treize jours après l'injection intraveineuse de 30 milligrammes de bacilles de la fléole. Tubercule avec amas microbien central et début d'un processus de suppuration. Grossissement : 150 diamètres.



FIG. 4. — Aspect du poumon (cobaye) quarante-cinq jours après l'injection intraveineuse de 30 milligrammes de bacilles de la fléole. Tubercule ancien, amas microbien central, réaction scléreuse périphérique intense. Grossissement : 100 diamètres.

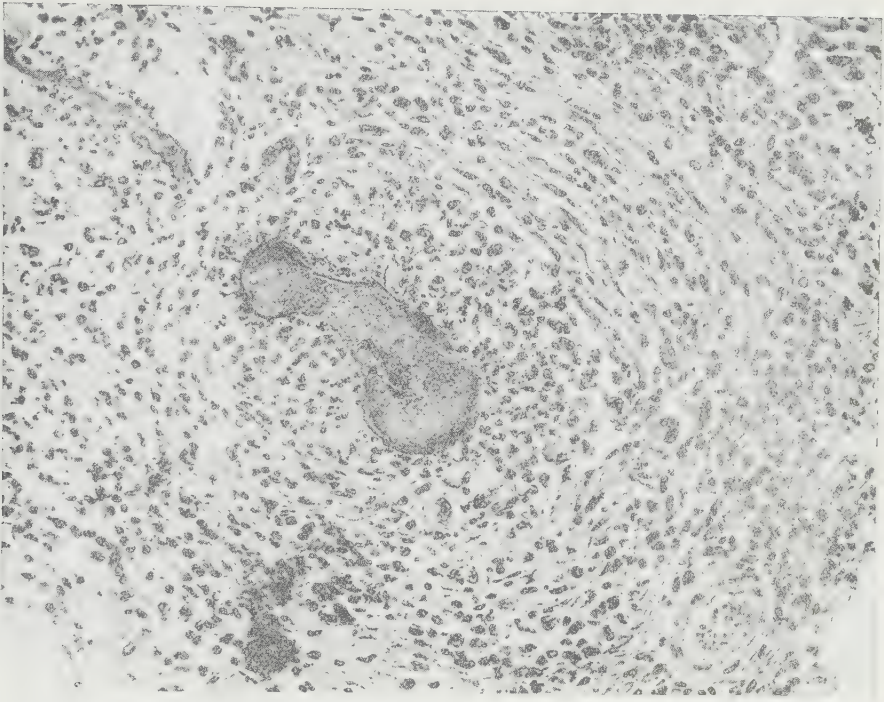


FIG. 5. — Même lésion pulmonaire que figure 4. Grossissement : 220 diamètres.

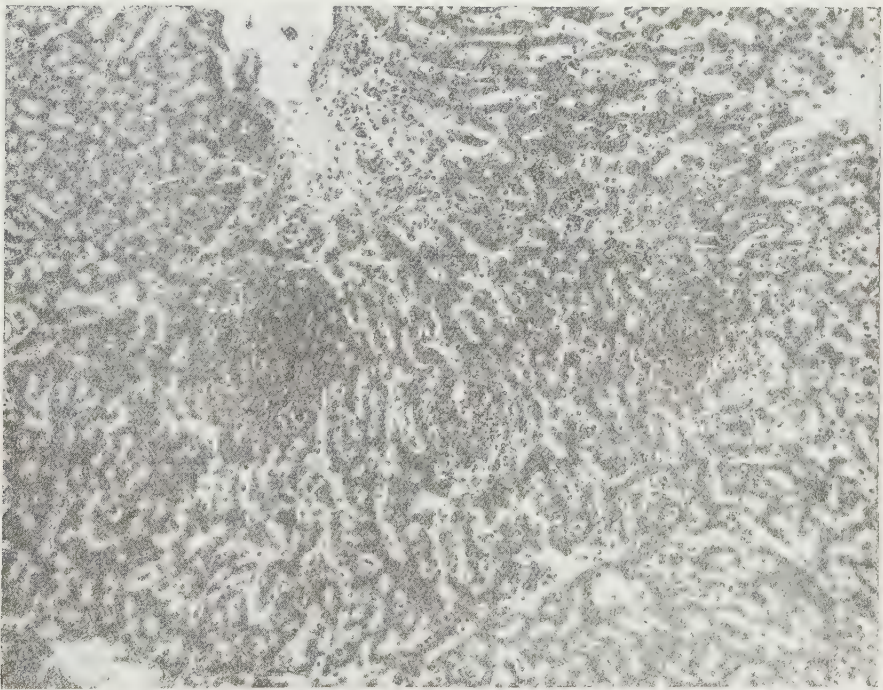


FIG. 6. — Aspect du foie (lapin) cinquante jours après l'injection intraveineuse de 100 milligrammes de bacilles de la fièvre. *Granulie*. Grossissement : 100 diamètres.

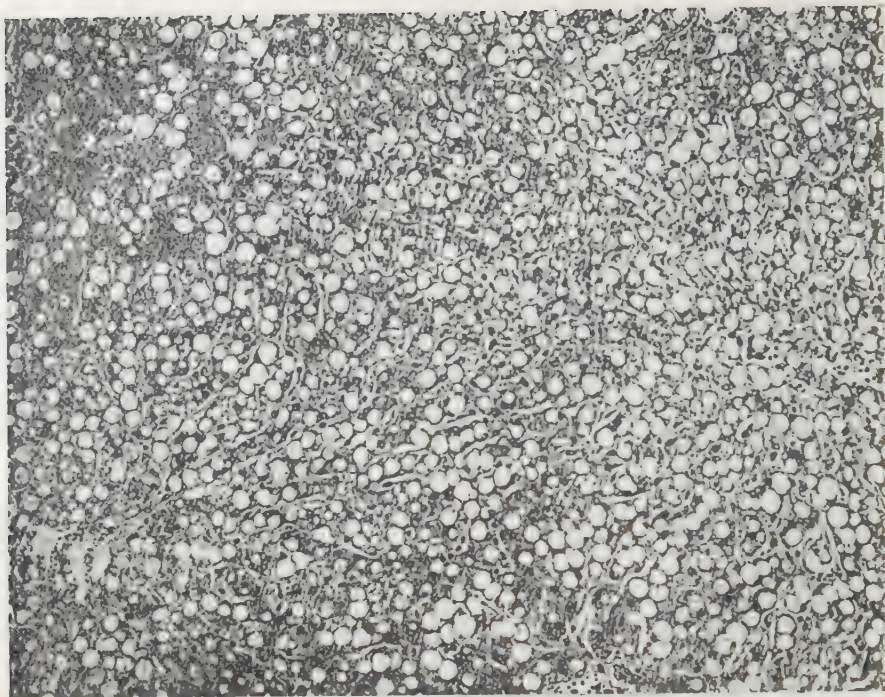


FIG. 7. — Aspect du foie (cobaye) dix jours après l'injection intraveineuse de 30 milligrammes de bacilles de la fléole. *Dégénérescence graisseuse*. Grossissement : 150 diamètres.

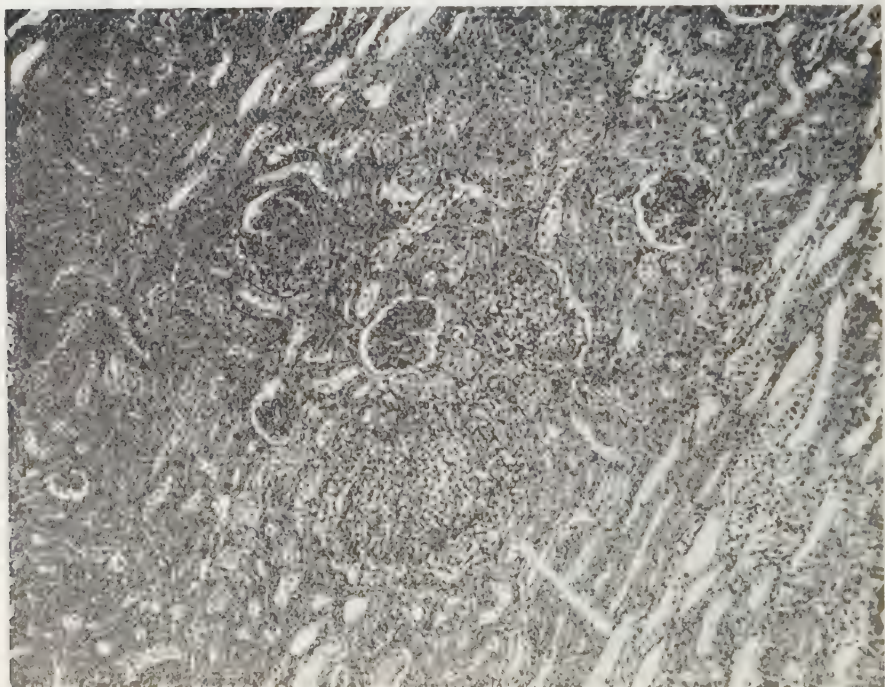


FIG. 8. — Aspect du rein (lapin) cinq jours après l'injection intraveineuse de 100 milligrammes de bacilles de la fléole. *Granulie*. Grossissement : 100 diamètres.

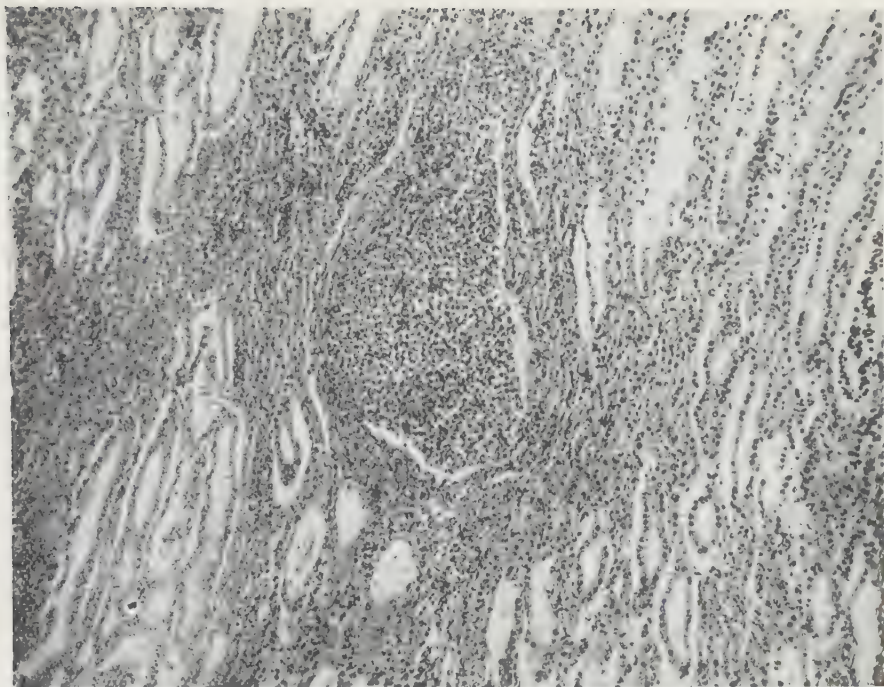


FIG. 9. — Aspect du rein (cobaye) dix jours après l'injection intraveineuse de 30 milligrammes de bacilles de la fièvre. *Début de suppuration d'un tubercule.* Grossissement : 100 diamètres.

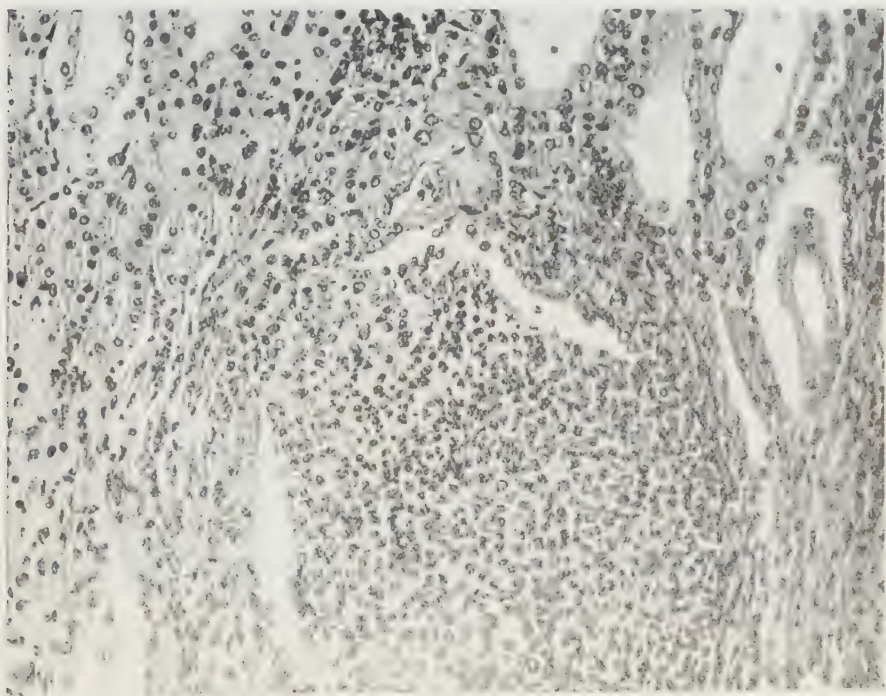


FIG. 10. — Mêmes lésion rénale. Grossissement : 220 diamètres.

différents antigènes sont à peu près superposables; ascension brusque de la première saignée, pratiquée entre le quatrième et le treizième jour, à la deuxième, où les sérums ont acquis un maximum d'anticorps; descente rapide en deux étapes (Exemple : sérum n° 65, titré avec les trois antigènes).

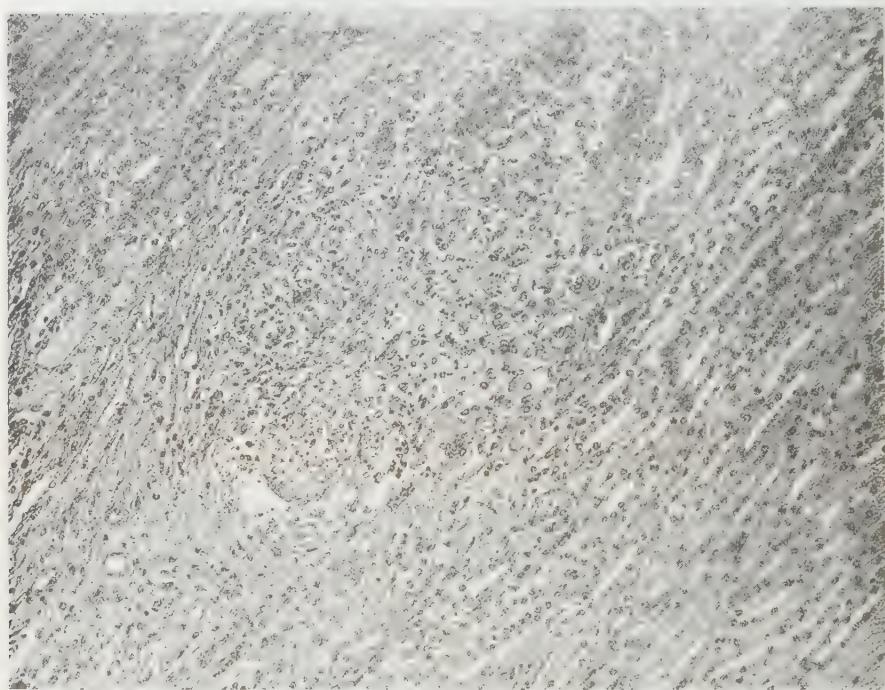


FIG. 41. — Aspect du rein (cobaye) trente jours après l'injection intraveineuse de 30 milligrammes de bacilles de la fièvre. Réaction scléreuse. Grossissement : 450 diamètres.

Photomicrographies de P. Jeantet.

Institut Pasteur, Paris.

De même, nous avons recherché les anticorps en présence de l'antigène tuberculeux avec tous les sérums provenant des dix lapins inoculés avec le bacille de la fièvre, et nous avons constaté que ces anticorps sont décelés plus précocement par l'antigène tuberculeux que par l'antigène homologue.

**Titrage des anticorps de trois sérums antibacilles de la fléole
en présence de l'antigène tuberculeux
et de divers antigènes paratuberculeux.**

| NUMÉRO DU SÉRUM | ANTIGÈNE utilisé dans la réaction | PREMIÈRE SAIGNÉE prélevée 13, 9, 7 jours après l'inoculation | DEUXIÈME SAIGNÉE 15 jours après la première saignée | TROISIÈME SAIGNÉE 30 jours après la première saignée | QUATRIÈME SAIGNÉE 45 jours après la première saignée | CINQUIÈME SAIGNÉE 60 jours après la première saignée |
|-----------------|---|---|---|--|--|--|
| | | unités | unités | unités | unités | unités |
| 65 | Fléole. | 50 | 650 | 350 | 50 | 50 |
| | Tuberculeux. | 80 | + 450 | 300 | 200 | 200 |
| | Grassberger. | + 90 | + 650 | + 450 | 400 | |
| 52 | Fléole. | 40 | 300 | 50 | | |
| | Tuberculeux. | 30 | 250 | 200 | | |
| | Grassberger. | 40 | 450 | 200 | | |
| 59 | Fléole. | 40 | 500 | 300 | | |
| | Preisz. | 40 | 150 | 100 | | |
| | Tuberculeux. | 70 | 450 | 300 | | |

CONCLUSIONS.

Le bacille de la fléole et, d'une manière générale, les bacilles paratuberculeux acido-résistants ont des propriétés antigènes en ce sens que leurs extraits méthyliques dévient le complément avec les sérums homologues et qu'ils provoquent l'apparition d'une sensibilisatrice dans le sérum des animaux auxquels on les inocule.

Les extraits méthyliques des bacilles paratuberculeux fixent également l'alexine, à des titres divers, en présence des sérums homologues et des sérums antituberculeux. Mais leur pouvoir antigène, mesuré en présence de la sensibilisatrice homologue, est inférieur à celui des antigènes tuberculeux.

In vivo le bacille de la fléole forme des anticorps qui dévient le complément non seulement avec l'antigène correspondant, mais aussi avec les extraits méthyliques de bacilles paratuberculeux et de bacilles de Koch. Ces réactions de fixation s'entrecroisent et les substances qui les provoquent apparaissent ainsi dépourvues de spécificité.

La propriété antigène commune aux bacilles paratuberculeux et aux bacilles tuberculeux paraît attribuable à la présence,

dans les extraits méthyliques de ces germes, de substances appartenant au groupe des phosphatides solubles dans l'alcool méthylique et insolubles dans l'acétone.

C. — PROPRIÉTÉS ALLERGISANTES

I. — Sensibilité aux corps microbiens homologues et hétérologues des cobayes et des lapins sensibilisés par le bacille de la fléole.

D'après A. Boquet et L. Nègre, les bacilles paratuberculeux sensibilisent les cobayes aux germes homologues, mais plus faiblement que les bacilles aviaires, et surtout que les bacilles tuberculeux virulents ou non. L'inoculation sous-cutanée de 10 à 15 milligrammes de bacilles de Grassberger ou de bacilles de la fléole à des cobayes neufs détermine un léger œdème et un épaissement qui se résorbent. Si l'on répète ces injections toutes les trois ou quatre semaines sur les mêmes animaux, l'œdème augmente de plus en plus et laisse après lui une petite induration ou un abcès. A partir de la quatrième inoculation il se produit un phénomène de Koch. Le caractère nécrotique de la lésion de réinfection s'accroît au cours des inoculations ultérieures. De plus, on observe, comme pour les bacilles aviaires, une réviviscence des foyers anciens. Cantacuzène en 1905 avait signalé que, lorsqu'on fait au lapin des injections successives de bacilles de la fléole à des intervalles assez rapprochés pour que la résorption des bacilles de l'inoculation précédente soit incomplète, le volume des abcès croît avec le nombre des inoculations. Cantacuzène rapproche ce fait du phénomène de Koch, car les injections répétées de bacilles tuberculeux tués provoquent la formation de masses caséuses de plus en plus grandes. Bruno et Erich Lange concluent également que les bacilles paratuberculeux peuvent déterminer un phénomène de Koch chez les cobayes tuberculeux, à la condition qu'ils soient injectés à des doses plus fortes que les bacilles tuberculeux.

Dans le dessein de compléter l'étude comparative des pro-

priétés sensibilisantes de divers bacilles acido-résistants, nous avons préparé des lapins et des cobayes en leur inoculant respectivement, par diverses voies, des bacilles de Koch virulents (types humain et bovin), des bacilles aviaires, des bacilles de Johne et des bacilles paratuberculeux saprophytes (bacilles de la fléole, *Grassbacillus*, bacilles de Grassberger et bacilles de Preisz) et nous les avons éprouvés, après un temps variable, par inoculation intradermique de germes homologues et de germes du même groupe. Pour déclencher le phénomène de Koch, nous avons injecté, dans le derme des cobayes ainsi préparés, 5 et 10 milligrammes de corps bacillaires vivants en suspension homogène dans 0 c. c. 1 ou 0 c. c. 2 d'eau physiologique. Puis nous avons suivi l'évolution de la lésion à partir de la vingt-quatrième heure jusqu'à la régression des phénomènes inflammatoires. Quant à l'interprétation des réactions, nous l'avons toujours faite comparativement avec celles des animaux neufs témoins.

a) SENSIBILITÉ DERMIQUE AU BACILLE DE LA FLÉOLE DES COBAYES
SENSIBILISÉS PAR LE BACILLE DE LA FLÉOLE.

Nous avons sensibilisé un lot de cobayes par la voie dermique avec 50 milligrammes de bacilles de la fléole, puis nous les avons éprouvés, après un délai de seize jours, en injectant dans l'épaisseur du derme 10 milligrammes de bacilles de la fléole; des cobayes ayant reçu 20 et 30 milligrammes de bacilles de la fléole par la voie circulatoire ont été éprouvés onze et dix-neuf jours plus tard; enfin des cobayes sensibilisés par inoculation intrapéritonéale de 50 et 100 milligrammes de bacilles de la fléole ont été éprouvés onze et vingt-deux jours plus tard.

La réaction locale ainsi obtenue diffère par son aspect nécrotique précoce, son intensité plus grande et sa plus longue durée, de la réaction inflammatoire et suppurative que provoque l'inoculation de la même dose de bacilles de la fléole dans le derme des cobayes normaux. Elle est comparable en tout point au phénomène décrit par R. Koch chez les cobayes tuberculeux auxquels on réinocule par la voie sous-cutanée une dose massive de bacilles humains ou bovins.

b) SENSIBILITÉ DERMIQUE AUX BACILLES DE GRASSBERGER,
Grassbacillus ET PREISZ, DES COBAYES SENSIBILISÉS
PAR LE BACILLE DE LA FLÉOLE.

Chez les cobayes neufs, l'inoculation intradermique de 10 milligrammes de bacilles paratuberculeux de Grassberger, *Grassbacillus* et Preisz ne détermine qu'une réaction inflammatoire très discrète.

De même les cobayes sensibilisés par la voie circulatoire avec 10, 20, 30 et 40 milligrammes de bacilles de la fléole, puis éprouvés après un délai de quarante-trois, quarante, trente-trois à quarante jours par inoculation intradermique de 10 milligrammes de bacilles de Grassberger, de *Grassbacillus* et de Preisz ont présenté des réactions locales modérées quoique nettement plus intenses que celles des cobayes neufs. Des cobayes sensibilisés avec 50 et 100 milligrammes de bacilles de la fléole par la voie péritonéale ou avec 200 milligrammes de bacilles de la fléole par la voie sous-cutanée ont réagi également les quarante-troisième et vingt et unième jours par des phénomènes inflammatoires et nécrotiques de faible intensité à l'inoculation des divers types de bacilles paratuberculeux.

Par contre, tous les cobayes sensibilisés depuis dix-sept jours, par inoculation intradermique de 50 milligrammes de bacilles de la fléole, ont présenté un phénomène de Koch typique après l'inoculation dans le derme de 10 milligrammes de bacilles de Koch stérilisés par la chaleur.

c) RÉACTION THERMIQUE DES LAPINS SENSIBILISÉS
AVEC LE BACILLE DE LA FLÉOLE
AUX CORPS MICROBIENS HOMOLOGUES ET HÉTÉROLOGUES.

Le bacille de la fléole, le bacille de Grassberger, le *Grassbacillus* et le bacille de Preisz, injectés à la dose de 10 milligrammes par la voie veineuse à des lapins sensibilisés depuis trente jusqu'à trente-cinq jours par inoculation intraveineuse, intrapéritonéale ou sous-cutanée de bacilles de la fléole, ont provoqué régulièrement une réaction thermique de 1°2 à 1°5

entre la quatrième et la cinquième heure. Aucun de ces différents bacilles injectés à la même dose n'a déterminé d'hyperthermie chez les lapins neufs témoins.

II. — Sensibilité aux extraits bacillaires homologues et hétérologues des cobayes et des lapins sensibilisés par le bacille de la fléole.

Ramon et Ravaut, Ledoux-Lebard, Krompecher extraient des cultures en bouillon glycérimé du bacille pisciaire, âgées de trente jours, un produit qui, inoculé à la dose de 4 cent. cubes au cobaye tuberculeux, provoque une réaction thermique : 38°3-39°5. Terre a également obtenu des cultures du bacille de la carpe des produits solubles donnant sur les animaux tuberculeux les mêmes réactions que la tuberculine des bacilles humains. Borrel, Pinoy et Burnet, malgré l'inoculation par la voie sous-cutanée et par la voie cérébrale de doses énormes d'extraits bacillaires ou de bacilles (600 milligrammes) tués par la chaleur n'ont pu mettre en évidence l'existence de tuberculine active dans les bacilles paratuberculeux, ainsi que dans les extraits glycérimés de leurs cultures. Par contre, Weber et Bofinger démontrent que les paratuberculines produisent, chez l'homme et chez les animaux tuberculeux, une réaction analogue à celle que donne la tuberculine vraie.

D'après Irimescu, l'injection sous-cutanée de 1/4 de cent. cube de paratuberculine du bacille de Pétri-Rabinowitsch détermine une élévation thermique de 2° chez les cobayes tuberculeux. Cette dose suffirait même pour amener la mort de ces animaux.

Des résultats identiques furent obtenus avec la paratuberculine du bacille de la fléole, du bacille pisciaire et du bacille de l'orvet. La courbe thermique observée après l'injection sous-cutanée de 2 cent. cubes de paratuberculine, chez l'homme tuberculeux, est semblable à celle que l'on constate avec la tuberculine de Koch. Irimescu rapproche la paratuberculine de la tuberculine vraie sans toutefois les identifier, car la première tue rarement les animaux tuberculeux.

Coulaud, Moeller, Selter, Ludwig Lange, Long et W. Micu-

licz-Radecki estiment que les paratuberculines provoquent des réactions en tous points semblables aux réactions tuberculiniques.

Selon Bruno et Erich Lange, il faut employer des quantités de paratuberculine supérieures à celles de la tuberculine de Koch pour déterminer chez le cobaye tuberculeux une intradermo caractéristique. Les réactions positives typiques disparaissent plus rapidement que les réactions tuberculiniques vraies. L'homme tuberculeux réagirait plus fortement aux paratuberculines des bacilles acido-résistants saprophytes qu'à la tuberculine ancienne de Koch.

A. Boquet et L. Nègre démontrent que les paratuberculines des bacilles de la fléole et de Grassberger, à la dose de 1 cent. cube, ne sont pas toxiques pour les cobayes tuberculeux et que les animaux sensibilisés par les bacilles paratuberculeux résistent parfaitement à l'inoculation intrapéritonéale de plusieurs doses de tuberculine mortelles pour l'animal tuberculeux. Ils en concluent que les bacilles tuberculeux et paratuberculeux contiennent une substance commune ou des substances de composition voisine, qui interviennent dans les réactions d'hypersensibilité, et que ces substances diffèrent des groupes toxiques qui caractérisent les bacilles de Koch. C'est ce que nous avons cherché à vérifier par les expériences suivantes :

a) SENSIBILITÉ A LA PARATUBERCULINE HOMOLOGUE DES COBAYES
INOCULÉS AVEC LE BACILLE DE LA FLÉOLE.

1° SENSIBILITÉ DERMIQUE. — Nous avons éprouvé par injection intradermique de 0 c. c. 1 de fléoline, diluée au 1/10 dans l'eau physiologique, sept cobayes qui avaient reçu, depuis trois jusqu'à dix-sept jours, dans la veine jugulaire, des doses variées de bacilles de la fléole allant de 10 à 40 milligrammes en suspension homogène dans 1 c. c. 5 d'eau physiologique. Indépendamment de la quantité de germes utilisés pour la sensibilisation des animaux et de la durée de l'incubation, nous avons toujours observé, consécutivement à ces inoculations d'épreuve, des réactions semblables, de faible intensité. Vingt-quatre heures après l'injection de fléoline, il s'est produit dans la zone

injectée une réaction inflammatoire, avec un érythème diffus et une légère infiltration. Quarante-huit heures après, la réaction gardait presque les mêmes caractères. Les jours suivants, l'érythème pâlisait et il restait un petit nodule arrondi, mobile, de faibles dimensions. Ces réactions faibles ne rappelaient nullement l'intensité des phénomènes inflammatoires et nécrotiques de la réaction tuberculinique.

Quelques cobayes du même lot ont été éprouvés par la suite avec une dose plus forte de fléoline injectée dans le derme (0 c. c. 3 d'une dilution au 1/8). Leur réaction a été plus prononcée; plaque œdémateuse de 20 millimètres de diamètre, avec un centre livide et d'aspect nécrotique, entouré d'une zone érythémateuse.

A titre de comparaison nous avons pratiqué l'intradermo-réaction avec 0 c. c. 1 de fléoline au 1/10 et avec 0 c. c. 3 d'une dilution au 1/8 chez quatre cobayes neufs. Nous avons obtenu seulement des petits nodules inflammatoires et un érythème discret.

Des cobayes sensibilisés avec 200 milligrammes de bacilles de la fléole, par la voie sous-cutanée ou par inoculation intradermique ou encore par inoculation intrapéritonéale de 50 à 100 milligrammes de ces bacilles, ont été éprouvés par injection intradermique de 0 c. c. 1 de fléoline diluée au 1/10, après un délai variant de trois à vingt-cinq jours. Tous ont présenté des réactions légères.

Il résulte de ces expériences que les cobayes sensibilisés par le bacille de la fléole réagissent à l'inoculation intradermique de l'extrait bacillaire correspondant. La quantité de germes utilisés pour la sensibilisation et la voie d'inoculation n'exercent aucune influence appréciable sur la réactivité des cobayes à la fléoline.

2° SENSIBILITÉ THERMIQUE. — L'injection intrapéritonéale de 0 c. c. 5 de fléoline chez le cobaye neuf ne provoque aucune réaction thermique. Par contre, nous avons observé une élévation de 1°1 consécutivement à l'injection intrapéritonéale de 0 c. c. 1 de fléoline chez les cobayes qui avaient reçu, depuis dix-neuf à cinquante-trois jours, des doses allant de 30 à 200 milligrammes de bacilles de la fléole. Des cobayes éprouvés

cent sept jours après la sensibilisation avec les mêmes germes n'ont pas réagi à l'injection de 0 c. c. 5 de fléoline.

Dès le neuvième jour après l'inoculation intraveineuse, péritonéale ou sous-cutanée de bacilles de la fléole et jusqu'au quatre-vingt-dix-septième jour, les lapins réagissent par une hyperthermie supérieure à 4° à l'inoculation intraveineuse de 1 cent. cube d'une dilution au 1/10 de fléoline. C'est seulement à partir du cent-septième jour que les épreuves au moyen de la fléoline sont restées négatives.

b) SENSIBILITÉ AUX PARATUBERCULINES HÉTÉROLOGUES
DES COBAYES SENSIBILISÉS PAR LE BACILLE DE LA FLÉOLE.

Les cobayes neufs témoins ne réagissent pas à l'inoculation intradermique de 0 c. c. 2 des paratuberculines des bacilles de Grassberger, Preisz et *Grassbacillus*. Nous avons éprouvé, par injection intradermique de 0 c. c. 2 de ces extraits bacillaires, dilués au 1/10, un certain nombre de cobayes sensibilisés depuis trente jusqu'à soixante-dix-huit jours, par des voies différentes, avec 10, 50 et 100 milligrammes de bacilles de la fléole. Tous ont réagi nettement. Nous pouvons en conclure que le bacille de la fléole sensibilise les cobayes aux paratuberculines hétérologues. Cependant lorsque le bacille est inoculé par toute autre voie que la voie circulatoire, la sensibilité paraspécifique est médiocre et ne se traduit à l'épreuve que par des réactions de faible intensité.

c) SENSIBILITÉ A LA TUBERCULINE DES COBAYES
ET LAPINS SENSIBILISÉS PAR LE BACILLE DE LA FLÉOLE.

a) COBAYES. — Des cobayes qui avaient reçu des quantités allant de 100 à 200 milligrammes de bacilles de la fléole par diverses voies (circulatoire, péritonéale, sous-cutanée) ont été éprouvés après une incubation allant de trois jusqu'à dix-sept jours. Aucun d'eux n'a réagi. Les mêmes cobayes, éprouvés à différentes reprises avec des doses plus élevées de tuberculine allant jusqu'à 0 c. c. 3 d'une dilution au 1/8, n'ont présenté aucune réaction nette.

De réactions de faible intensité ont été obtenues chez ces animaux avec les mêmes doses de tuberculine aviaire.

b) LAPINS. — Vingt et un lapins sensibilisés par des bacilles de la fléole par la voie circulatoire ont réagi à partir du neuvième jour jusqu'au quatre-vingt-dixième jour à l'injection intraveineuse de 0 c.c. 3 de tuberculine brute (diluée au 1/10 dans l'eau physiologique). Les lapins inoculés dans les mêmes conditions par les voies péritonéale et sous-cutanée ne réagirent pas même à des fortes doses de tuberculine.

III. — Propriétés réactionnelles et toxiques du bacille de la fléole et de la fléoline à l'égard des cobayes et des lapins sensibilisés par divers bacilles paratuberculeux et les bacilles tuberculeux.

1^o RÉACTION DERMIQUE. — Cinq cobayes sensibilisés avec 15 milligrammes de bacilles de Johnne par la voie péritonéale ont été éprouvés cinq mois après par injection intradermique de 0 c.c. 1 de fléoline diluée au 1/10. Un d'eux seulement a présenté une réaction intense avec des phénomènes inflammatoires marqués et suivis de nécrose.

Quatorze cobayes sensibilisés avec 0 gr. 001 de bacilles bovins par voie sous-cutanée ont été éprouvés, comme les précédents, après un délai de trois mois. Tous ces animaux ont présenté des réactions de faible intensité caractérisées par de l'érythème et une infiltration discrète qui ont disparu rapidement.

Nous avons également éprouvé à la fléoline trois cobayes qui avaient reçu trois mois auparavant 1 milligramme de bacilles aviaires par voie péritonéale. Ils ont présenté une réaction intense qui rappelait par ses caractères inflammatoires et nécrotiques la vraie réaction tuberculinique.

Tous ces animaux sensibilisés par le bacille de Johnne, le bacille tuberculeux bovin ou le bacille tuberculeux aviaire ont réagi par un phénomène de Koch typique, à l'inoculation intradermique de 5 milligrammes de bacilles de la fléole.

2^o RÉACTION THERMIQUE. — Deux lapins ayant reçu 0 milligr. 1

de bacilles de Koch dans la veine deux mois auparavant firent une ascension thermique de 1°6, l'une après une injection de 0 c. c. 1 de fléoline, l'autre après une injection intraveineuse de 10 milligrammes de bacilles de la fléole.

De 5 lapins sensibilisés avec 25 milligrammes de bacilles de Johne par la voie veineuse, deux mois auparavant, un seul réagit (1°7) à la fléoline.

De deux cobayes sensibilisés avec 0 milligr. 1 de bacilles bovins Vallée trois mois auparavant un seul a réagi à 0 c. c. 1 de fléoline.

PROPRIÉTÉS TOXIQUES

DES BACILLES DE LA FLÉOLE ET DE LA FLÉOLINE.

Dix cobayes sensibilisés avec des quantités variées, allant de 10 milligrammes jusqu'à 200 milligrammes, de bacilles de la fléole par voie circulatoire, péritonéale, sous-cutanée et dermique depuis vingt jusqu'à cinquante-cinq jours, ainsi que des cobayes tuberculisés depuis plus de deux mois, ont supporté sans dommage une nouvelle quantité de bacilles variant de 30 à 250 milligrammes, et 1 cent. cube de fléoline inoculée par la voie péritonéale.

Ces expériences démontrent l'absence de toxicité du bacille de la fléole et de la fléoline à l'égard des animaux allergiques.

Conclusions générales.

Le bacille de la fléole, s'il est injecté au cobaye sous la peau ou dans le péritoine, ne provoque que des lésions locales.

Par contre, inoculé dans la veine, à des doses allant jusqu'à 100 milligrammes, il donne lieu à une sorte de granulie à prédominance rénale et pulmonaire, qui évolue vers la guérison par cicatrisation fibreuse. Cependant, cette dose massive ne tue pas les animaux. La mort, lorsqu'elle se produit, est la conséquence d'infections secondaires par les « microbes de sortie ».

Le bacille de la fléole et les autres bacilles paratuberculeux ont des propriétés antigènes *in vivo* et *in vitro*.

Leurs extraits méthyliques fixent l'alexine en présence des

sérums homologues et des sérums antituberculeux, mais leur pouvoir antigène est inférieur à celui de bacilles tuberculeux.

In vivo, le bacille de la fléole forme des anticorps qui dévient le complément avec l'antigène homologue et avec l'extrait méthylique de bacilles de Koch. Toutes ces réactions s'entrecroisent, et les substances qui les provoquent apparaissent ainsi dépourvues de spécificité.

Au même titre que les divers types de bacilles tuberculeux, le bacille de la fléole est doué de propriétés allergisantes, sensibilisantes et déchainantes à l'égard du lapin et du cobaye. Bien qu'il n'engendre aucune lésion tuberculeuse vraie, il sensibilise les animaux neufs à l'inoculation intradermique ultérieure de bacilles de la fléole vivants et de l'extrait de ces germes. Mais ce bacille est beaucoup moins actif dans son pouvoir sensibilisant que les bacilles pathogènes; il est nécessaire, pour préparer les animaux, de leur inoculer une grande quantité de germes. D'autre part, la sensibilité à l'extrait du bacille de la fléole n'est nullement en rapport avec la quantité de bacilles inoculés pour la préparation de l'animal et avec les voies de cette inoculation préparante.

Outre ses propriétés sensibilisantes, le bacille de la fléole possède des propriétés déchainantes en ce sens qu'il provoque le phénomène de Koch chez les cobayes sensibilisés avec le germe homologue. Toutefois les doses nécessaires pour produire l'eschare sont plus élevées pour le bacille de la fléole que pour les bacilles tuberculeux virulents ou avirulents.

Les diverses manifestations générales et locales de cet état d'hypersensibilité peuvent être éveillées non seulement par les bacilles homologues et par leurs extraits (paratuberculines), mais aussi par les bacilles paratuberculeux appartenant à d'autres espèces et par leurs extraits, et même par les bacilles tuberculeux et les tuberculines. Réciproquement, chez les cobayes tuberculeux, des réactions locales (phénomène de Koch) peuvent être provoquées par l'inoculation intra-cutanée de bacilles paratuberculeux vivants. Contrairement à ce qu'on observe avec les bacilles tuberculeux il n'y a pas de différences entre les propriétés réactionnelles des divers bacilles paratuberculeux.

Il faut donc admettre que les différents germes tuberculeux

et paratuberculeux contiennent des substances de composition et de structure très voisines dont dépendent ces phénomènes de cosensibilisation.

Le bacille de la fièvre laisse diffuser dans le milieu de culture une paratuberculine dont l'activité réactionnelle est beaucoup plus faible que celle de la tuberculine de Koch à l'égard des cobayes hypersensibles. Cette paratuberculine, injectée dans le derme ou dans la circulation des animaux sensibilisés par d'autres bacilles paratuberculeux ou par des bacilles tuberculeux, provoque les mêmes réactions que la tuberculine chez les animaux sensibilisés par le bacille de Koch. Mais elle n'est pas toxique, même à haute dose, pour ces animaux. D'où l'on peut conclure avec A. Boquet et L. Nègre que si la fièvre renferme des substances réactionnelles analogues à celles de la tuberculine, elle diffère de cette dernière par l'absence de l'élément toxique qui entraîne la mort des animaux tuberculeux.

De même, les corps microbiens du bacille de la fièvre qui déterminent une réaction thermique chez l'animal sensibilisé par le bacille de la fièvre sont également atoxiques pour l'animal neuf, pour l'animal sensibilisé et pour l'animal tuberculeux.

Les paratuberculines des bacilles de Grassberger, *Grassbacillus*, de Preisz, se comportent comme la fièvre à l'égard des animaux allergiques. Toutefois celle du bacille de Grassberger est moins active.

Bacilles tuberculeux et paratuberculeux, outre leurs caractères morphologiques et leur acido-résistance, sont donc reliés entre eux par des propriétés antigènes, sensibilisantes et réactionnelles communes, qui autorisent à admettre l'existence, dans ces différents germes, de protéines et de lipoides de composition et de structure voisines.

La parenté des bacilles tuberculeux et paratuberculeux devient ainsi plus évidente. Représentants d'un même groupe de mycobactéries, ils dérivent peut-être d'un ancêtre commun, dont un petit nombre de descendants (bacilles tuberculeux, bacille de la lèpre, bacille de Johne) se seraient adaptés héréditairement à la vie parasitaire. Mais rien jusqu'ici n'autorise à admettre la possibilité d'une transformation inverse, c'est-à-

dire la régression d'un bacille acido-résistant pathogène en bacille acido-résistant saprophyte.

Nous exprimons nos remerciements très reconnaissants à M. A. Boquet, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, qui nous a constamment guidée et nous a donné des renseignements précieux, ainsi qu'à M. le D^r Coulaud qui nous a aidée dans la lecture des coupes histologiques et dans l'interprétation anatomo-pathologique de cette étude.

BIBLIOGRAPHIE

- BEZANÇON (F.) et PHILIBERT (A.), Relations entre le bacille de Koch et les bacilles acido-résistants. *Congrès Internat. de la Tuberculose*, 1, 1905.
- BOQUET (A.) et NÈGRE (L.), Sur l'hypersensibilité aux tuberculines et aux bacilles de Koch dans la tuberculose expérimentale. *Ces Annales*, janvier 1926.
- BOQUET (A.) et NÈGRE (L.), Sur les propriétés biologiques des lipoides du bacille tuberculeux. *Ces Annales*, 37, septembre 1923.
- BORREL (A.), Bacilles tuberculeux et paratuberculeux. *Bull. Inst. Pasteur*, mai 1904.
- CALMETTE (A.), Existe-t-il dans la nature ou peut-on créer artificiellement des formes saprophytiques du bacille de Koch qui soient capables de se transformer en bacille tuberculeux virulent? Conf. Internat. de Lausanne. *Rev. de la Tuberculose*, n° 6, décembre 1924.
- CANTACUZÈNE (J.), Recherches sur l'infection expérimentale par les bacilles paratuberculeux (bacille de Timothée). *Congrès Internat. de la Tuberculose*, 1905.
- COULAUD (E.) [cité par A. Calmette], La conférence internationale de Lausanne. *Rev. de la Tuberculose*, n° 6, décembre 1924.
- DIETRICH (W.), Vergleichende Prüfung von Tuberkulinen verschiedener Herkunft. *Deut. Med. Woch.*, 14 avril 1921.
- IRIMESCU (S.), Action comparée des paratuberculines. *C. R. Soc. de Biol.*, 4 novembre 1905.
- LONGE (B.), Zur frage der Virulenzsteigerung säurefester saprophyten durch Tierpassage. *Deut. Méd. Woch.*, 20 juillet 1922, p. 1000.
- LONGE (B.) et LONGE (E.), Die Reaktion des tuberkulösen organismus auf intrakutane Verimpfung säurefester Saprophyten und deren Tuberkuline. *Deut. Med. Woch.*, 23 février 1922.
- LONG (E.), Réinfections tuberculeuses et réactions tuberculiniques dans le testicule du cobaye tuberculeux. *Amer. Rev. of tuberculosis*, n° 8, 1924.
- MOELLER (A.), Mikroorganismen die den Tuberkelbacillen verwandt sind und bei Thiere eine miliare Tuberkelkrankheit verursachen. *Deut. Med. Woch.*, n° 24, juin 1898.
- NÈGRE (L.) et BOQUET (A.), Sur le pouvoir antigène des extraits méthyliques de bacilles tuberculeux. *Ces Annales*, 1921, p. 35.

- NÈGRE (L.), Sur les relations qui existent entre les bacilles paratuberculeux et les bacilles tuberculeux. *Rev. de la Tuberculose*, n° 2, avril 1924.
- POTET (M.), Étude sur les bactéries dites « acidophiles ». Les paratuberculi-bacilles. *Thèse de Médecine*, 1902.
- RODET (A.) et GALAVIELLE, Sur le pouvoir pathogène de certains bacilles acido-résistants. Essais de modification par les passages dans l'organisme animal. *Congrès Internat. de la tuberculose*, 1, 1905.
- TERRE, *Thèse de Médecine* (cité par A. Borrel. Bacilles tuberculeux et paratuberculeux. *Bull. Inst. Pasteur*, n° 2, 1904).
- URBAIN (Ach.), De la valeur antigène des bacilles tuberculeux et d'autres microbes cultivés dans le milieu à l'œuf. *Ces Annales*, 36, 1922.
- VALTIS (J.), Pouvoir antigène des bacilles paratuberculeux dans la réaction de fixation de la tuberculose. *C. R. Soc. de Biol.*, 86

RACES SEROLOGIQUES DU *B. PERFRINGENS*

par M^{lle} A. HOWARD.

(Travail du laboratoire de M. Weinberg.)

L'étude des types sérologiques des différentes espèces microbiennes prend de jour en jour une importance plus grande. Si, pour certaines espèces, surtout aérobies, on a nettement délimité par l'agglutination des races différentes d'un même microbe, il n'en est pas tout à fait de même en ce qui concerne les microbes anaérobies. Et parmi les espèces anaérobies les plus fréquentes, on constate avec surprise que la question des différentes races sérologiques du *B. perfringens* a été fort peu étudiée.

D'ailleurs, le *B. perfringens* ne semble pas donner naissance à une formation abondante d'agglutinines. C'est ainsi que le sérum des sujets atteints d'une infection à *B. perfringens* agglutine très rarement ou très peu ce microbe. E. Klein, dès 1898, n'a pu obtenir d'agglutinines chez les animaux de laboratoire, en injectant une dose mortelle ou non mortelle de *B. perfringens*.

Pic et Lesieur, soutenant que le bacille d'Achalme, maintenant identifié comme *B. perfringens*, était la cause du rhumatisme articulaire aigu, ont cherché (1899) les agglutinines pour ce bacille dans le sérum des malades atteints de cette maladie. Bien qu'ayant trouvé le bacille d'Achalme dans un certain nombre de cas, ils ne sont jamais arrivés à déceler d'agglutinines pour ce microbe dans le sérum des malades.

Herter (1906) confirmant les expériences de Theobald Smith (1906) constate que le sérum des malades atteints d'anémie pernicieuse, chez lesquels la flore intestinale est composée presque exclusivement de *B. aerogenes capsulatus* (*B. perfringens*), n'a jamais agglutiné une culture du même microbe. Cependant, Hewlett (1911) rapporte quelques cas où le sérum d'un malade infecté par le *B. welchii* (*B. perfringens*) renfermait des agglutinines pour ce microbe.

La préparation de sérums agglutinants anti-*perfringens* sur l'animal a donné lieu à des résultats contradictoires. C'est ainsi que Kamen (1904) a employé plusieurs méthodes d'immunisation, mais n'a jamais réussi à préparer un sérum agglutinant, même par l'injection de cultures vivantes.

Picchi (1907) a obtenu des résultats semblables. Mais Passini (1904) décrit des agglutinations positives avec le *B. welchii* et le sérum de malades atteints de diarrhée. Cependant, ses résultats sont douteux, car le sérum de ces mêmes malades agglutinait également le *B. putrificus*. Acceptant l'hypothèse de Schattenfroh et Grassberger, d'après laquelle il existe deux types de *B. perfringens*, le type sporulant et le type non sporulant, Passini a préparé trois sérums agglutinants, un sérum contre chaque type de *B. welchii* et un autre contre le *B. putrificus*.

Voici ses résultats :

1° Le sérum anti-*putrificus* agglutinait la souche homologue et le *B. perfringens* (type sporulant).

2° Le sérum anti-*perfringens* (type sporulant) agglutinait le type sporulant et le type non sporulant, et, en plus, le *B. putrificus* à des taux plus bas.

3° Le sérum anti-*perfringens* non sporulant agglutinait seulement les deux types de *B. perfringens*.

L'année suivante, Werner (1905), avec 4 souches de *B. perfringens* de différentes origines, a préparé 4 sérums agglutinants sur 4 lapins. Il injectait par voie intraveineuse, tous les six ou sept jours, un antigène qui consistait en une culture sur gélose inclinée tuée à 60° C en suspension dans de l'eau physiologique. Le sérum de chacun des 4 animaux agglutinait la souche homologue, mais pas les trois autres. Cependant le sérum d'un animal immunisé contre un *gaz-bacillus* provenant d'un échantillon de lait agglutinait un autre *gaz-bacillus* du même échantillon. Une des souches employées par Werner était une souche originelle de Fraenkel.

Rocchi (1911), cherchant une relation ou un élément de séro-diagnostic parmi les espèces de *B. perfringens* ou bien parmi les différentes souches de la même espèce, a préparé des sérums agglutinant le *B. perfringens*, le *B. chauvei*, le *B. botulinus* et plusieurs bacilles correspondant au *B. welchii*. Les résultats de ces agglutinations ont été négatifs.

Les souches de *B. welchii* étaient seulement agglutinées par les sérums homologues.

Weinberg et Seguin (1918) ont repris la question de la préparation d'un sérum agglutinant. Pensant que l'échec de tant d'auteurs était dû à ce qu'ils n'injectaient pas assez de corps microbiens, ils ont injecté au cheval plusieurs litres de culture en plusieurs mois, et le sérum obtenu agglutinait au 1/500-1/2.000 la souche homologue.

Simonds (1915) a étudié une cinquantaine de souches pour établir une classification des souches ou des types de *B. perfringens*. Avec 5 souches isolées par lui, il a préparé 5 sérums agglutinants en faisant des injections intra péritonéales aux lapins. Il n'a pas obtenu de très bons résultats. Il lui fut impossible de produire un sérum agglutinant de titre plus élevé que 1 p. 80 et encore avec des résultats variables suivant les souches. Pour deux de ces souches, il n'a pu produire d'agglutinines, même pour les souches homologues. Sur 23 souches, 10 n'étaient pas du tout agglutinées. Pour ses agglutinations, Simonds a toujours employé une culture de six jours en bouillon simple, non sucré sous huile; le dépôt du fond de ces cultures, émulsionné, lui servait d'antigène.

Sa tentative de classification sérologique des souches de *B. perfringens* n'ayant pas réussi, il a proposé une classification par groupe ou type basée sur le pouvoir fermentaire pour la glycérine et l'inuline, avec production d'acide et de gaz, ou sur la formation de spores dans un milieu alcalin contenant ces sucres. D'après lui, il existe 4 groupes biochimiques de *B. perfringens*.

Dans le paragraphe de notre mémoire consacré à l'étude comparative des types biochimiques et les types sérologiques de *B. perfringens* nous rappellerons sa classification.

En résumé, toutes les tentatives de préparer sur lapin un sérum agglutinant anti-*perfringens* de titre élevé ont échoué. Weinberg et Seguin ont préparé un sérum fortement agglutinant sur cheval, mais, pour nos études, le sérum de cheval convenait moins bien que le sérum de lapin, les recherches de Weinberg et Barotte ayant montré que le sérum normal de cheval renferme quelquefois des agglutinines anti-*perfringens*.

Recherches personnelles.

A. — AGGLUTINATION PAR LE SÉRUM DE CHEVAL
IMMUNISÉ CONTRE LE « B. PERFRINGENS ».

Nous avons repris cette étude et nous avons tenté d'isoler des types sérologiquement différents de *B. perfringens*. Nos recherches ont porté sur une soixantaine de souches du laboratoire de M. Weinberg. Ces souches étaient d'origines diverses comme le montre le tableau ci-contre :

| | |
|---|----|
| Flore de la gangrène gazeuse | 15 |
| Flore de l'appendicite | 28 |
| Flore normale de l'intestin | 4 |
| Sang et matières fécales au cours de la fièvre typhoïde . | 7 |
| Autres origines | 6 |

Nous avons d'abord étudié ces 60 souches avec les sérums de cheval préparés au laboratoire : un sérum antimicrobien, un sérum antitoxique, et un sérum mixte à la fois antitoxique et antimicrobien. Nous avons obtenu les résultats suivants :

| | |
|--|----|
| Souches agglutinées | 40 |
| Souches dépassant un taux de 1/5.000 (souche homologue). . | 1 |
| Souches entre 1/2.000 et 1/5.000 | 2 |
| Souches au dessus de 1/1.000 | 10 |
| Souches entre 1/300 et 1/1.000 | 3 |
| Souches entre 1/100 à 1/500 | 5 |
| Souches au-dessous de 1/100 | 19 |
| Souches non agglutinées | 20 |

B. — AGGLUTINATION PAR LE SÉRUM DE LAPIN.

Il restait 20 souches qui n'étaient pas agglutinées par le sérum de cheval. Parmi ces 20 souches, nous avons préparé 15 sérums agglutinants anti-*perfringens*. Nous avons vu que la plupart des auteurs ont obtenu très difficilement des sérums agglutinants anti-*perfringens* à des taux suffisamment élevés. Nous avons utilisé la technique suivante :

1° PRÉPARATION DES SÉRUMS AGGLUTINANTS. — Nous avons uti-

lisé le procédé de Davesne pour la préparation rapide d'un sérum agglutinant avec un antigène dont on ne pourrait sans danger augmenter les doses. Cet auteur a employé des cobayes, tandis que nous avons pris des lapins comme animaux d'immunisation.

Nous avons préparé trois lapins avec le même antigène microbien. Comme antigène nous nous sommes servi d'émulsion microbienne provenant d'une culture de *B. perfringens* de vingt-quatre heures en bouillon glucosé, centrifugée et reprise par l'eau physiologique. Cette émulsion fut chauffée une heure à 60°C au bain-marie. Nous avons injecté, par voie intraveineuse, des doses d'antigène de plus en plus fortes ($\frac{3}{4}$ de cent. cube, 1 cent. cube, 2 cent. cubes, 3 cent. cubes, 4 cent. cubes, etc.). Le lapin B-73 a reçu des doses croissantes d'antigène tous les trois jours, et en plus, immédiatement après l'injection d'émulsion microbienne, et sans retirer l'aiguille de la veine, 1 cent. cube de sérum normal de lapin. Le lapin B-74 fut également injecté tous les trois jours, mais ne reçut pas de sérum en même temps que l'antigène. Chez le lapin B-75, les injections d'antigène sans sérum furent pratiquées tous les six jours. Nous avons obtenu les résultats suivants :

| | TAUX D'AGGLUTINATION APRÈS : | | | | |
|--|------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | 2 jours | 16 jours | 30 jours | 35 jours | 33 jours |
| Lapin B-73 (antigène + sérum tous les 3 jours) | 1/250 | 1/500 | 1/1.000 | 1/2.500 | |
| Lapin B-74 (antigène seul tous les 3 jours) | 1/100 | 1/250 | 1/500 | 1/2.500 | |
| Lapin B-75 (antigène seul tous les 6 jours) | 0 | 1/100 | | 1/500 | 1/2.500 |

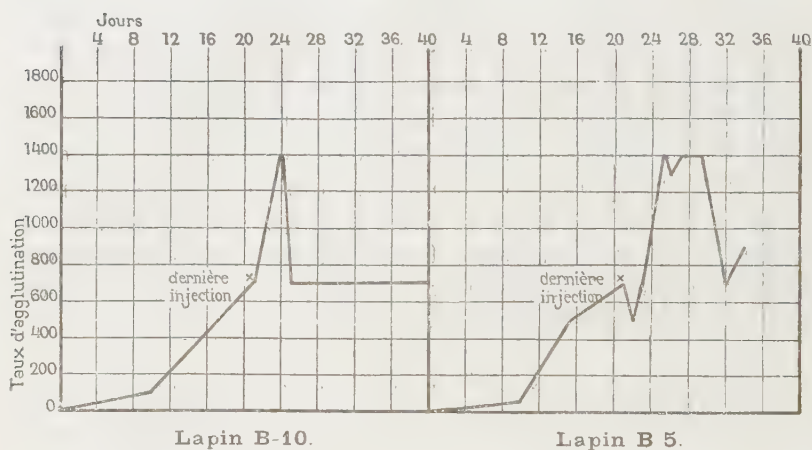
Lecture des résultats obtenus après 4 heures à 37°C.

Ce tableau nous permet de confirmer les conclusions de Davesne sur l'obtention plus rapide d'un sérum agglutinant par des injections rapprochées d'antigène microbien associées à des injections de sérum homologue. La différence entre le pouvoir agglutinant du sérum du lapin B-73 (antigène + sérum)

et le sérum du lapin B-74 (antigène seul) est surtout marquée dans le début de l'immunisation. Ce fait tient probablement aux proportions relatives du sérum et de l'antigène injectés, la dose de sérum restant fixe (1 cent. cube) et les doses d'antigène croissant à chaque injection.

En étudiant la courbe du pouvoir agglutinant après la dernière injection d'antigène, nous avons montré que si le pouvoir agglutinant du sérum chez les animaux hyperimmunisés par voie intraveineuse atteint son maximum dans les jours qui sui-

TABLEAU I.



vent immédiatement la dernière injection, il est inutile d'attendre huit jours ou plus, comme on le fait habituellement, pour la saignée, qui peut être pratiquée au bout de trois jours. Comme exemples, nous avons pris 4 des lapins qui nous avaient servi à obtenir des sérums agglutinants anti-*profringens*, selon la méthode d'immunisation exposée ci-dessus.

Le sérum du lapin B-72 agglutinait immédiatement avant la dernière injection la souche homologue à 1 p. 1.000. Ce taux n'a pas été modifié par cette dernière injection et s'est maintenu pendant neuf jours. Avant la dernière injection, le sérum du lapin B-7 agglutinait la souche homologue à 1 p. 1.000; le lendemain de la dernière injection le taux d'agglutination s'est élevé à 1 p. 1.200, s'est maintenu entre 1 p. 1.200 et 1 p. 1.400

pendant les six jours suivants et a commencé à baisser ensuite. Le pouvoir agglutinant du sérum du lapin B-10, de 1 p. 700 avant la dernière injection est monté quarante-huit heures après à 1 p. 1.000 pour redescendre le lendemain à 1 p. 700 et s'est ensuite maintenu à ce taux. Chez le lapin B-5 le pouvoir agglutinant était de 1 p. 700 avant la dernière injection. Il s'est élevé en trois jours jusqu'à 1 p. 4.400, est resté cinq jours à ce niveau, puis est redescendu à 1 p. 800.

En tenant compte de ces résultats, nous avons saigné tous nos lapins, utilisés pour la préparation de nos sérums agglutinants anti-*perfringens*, trois ou quatre jours après la dernière injection.

2° TECHNIQUE DE L'AGGLUTINATION. — Sur les 20 souches qui n'étaient pas agglutinées par le sérum de cheval, nous avons préparé sur lapin 15 sérums agglutinants, et, avec ces 15 sérums agglutinants, nous avons fait des agglutinations croisées avec toutes les souches du laboratoire. Nous nous sommes servi comme antigène d'une émulsion microbienne provenant d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon glucosé, centrifugée, reprise par l'eau physiologique et diluée quatre à cinq fois. Après quatre heures d'étuve à 37° C, on fait une première lecture, et on note une deuxième fois les résultats après avoir laissé les tubes de quinze à vingt-quatre heures à la température du laboratoire.

3° RÉSULTATS. — Nous ne donnerons pas intégralement les résultats que nous avons obtenus par l'étude de nos 60 souches différentes de *B. perfringens* avec les 15 sérums agglutinants que nous avons préparés sur lapin. Dans le tableau II (page 1410) nous avons montré qu'il était possible, avec 8 sérums différents, d'obtenir l'agglutination de ces différentes souches à une exception près. La souche n° 9, en effet, n'a été agglutinée au bout de vingt-quatre heures qu'à 1 p. 200 par le sérum de cheval préparé.

A un examen approfondi, on est frappé par ce fait que certaines souches possèdent des propriétés agglutinatives très accentuées puisqu'elles sont agglutinées à des taux variables par tous les sérums de lapin.

TABLEAU II. — Agglutination des 60 souches de *B. perfringens* avec 8 des 15 sérums agglutinants préparés sur lapins.

| SOUCHES de <i>B. perfringens</i> | SÉRUM 69 | SÉRUM 8 | SÉRUM 15 | SÉRUM 56 | SÉRUM 2 | SÉRUM 78 | SÉRUM 51 | SÉRUM 40 |
|--|---------------|---------------|---------------|-------------|-----------|---------------|-------------|---------------|
| 1 | 1.000 : 1.000 | 400 : 500 | 500 : 2.000 | 400 : 200 | 400 : 500 | 200 : 500 | 500 : 1.000 | 1.000 : 1.000 |
| 2 | — | — | — | — | 350 : 700 | — | — | — |
| 3 | 500 : 2.000 | — | 50 : 100 | — | — | 2.000 : 2.000 | — | — |
| 6 | 0 : 50 | — | 1.000 : 2.000 | 200 : 500 | — | — | — | — |
| 8 | — | 1.000 : 2.000 | — | — | — | — | — | — |
| 9 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 10 | 0 : 25 | — | — | — | — | — | — | — |
| 13 | 1.000 : 2.000 | 400 : 500 | 200 : 1.000 | 500 : 1.000 | 400 : 500 | 4.000 : 2.000 | — | 700 : 1.800 |
| 15 | — | — | 500 : 2.000 | — | — | — | — | 400 : 500 |
| 16 | 0 : 25 | 100 : 500 | 200 : 200 | 50 : 100 | 50 : 200 | 400 : 200 | 0 : 500 | — |
| 17 | 0 : 200 | — | 25 : 25 | — | 50 : 100 | 4.000 : 2.000 | — | 0 : 100 |
| 18 | 0 : 500 | — | — | — | 100 : 500 | — | — | — |
| 24 | — | 50 : 200 | — | 25 : 50 | — | — | — | 0 : 25 |
| 22 | — | — | — | 50 : 100 | — | — | — | — |
| 24 | 0 : 1.000 | 200 : 1.000 | 0 : 25 | — | — | — | 200 : 500 | — |
| 25 | — | — | 50 : 100 | — | 50 : 100 | 300 : 1.000 | — | 25 : 25 |
| 27 | — | — | 0 : 25 | — | 400 : 200 | 200 : 300 | — | — |
| 28 | — | — | — | — | — | 400 : 100 | — | — |
| 29 | 0 : 500 | — | — | — | — | — | — | 200 : 500 |
| 31 | 0 : 500 | — | 0 : 25 | — | — | — | — | — |
| 32 | 500 : 1.000 | 400 : 500 | 100 : 1.000 | — | — | 500 : 2.000 | — | — |
| 33 | — | 400 : 200 | — | 0 : 25 | — | — | 0 : 50 | 0 : 25 |
| 34 | 0 : 100 | 100 : 100 | 0 : 25 | — | — | — | 200 : 500 | — |
| 35 | — | — | — | 0 : 50 | — | — | — | — |
| 39 | 0 : 50 | 0 : 25 | — | — | 400 : 200 | — | — | — |
| 40 | 500 : 500 | 25 : 100 | 25 : 50 | — | 25 : 100 | 50 : 50 | 0 : 25 | 0 : 25 |
| 42 | 50 : 1.000 | — | 0 : 100 | 0 : 50 | 0 : 50 | 1.000 : 2.000 | — | 100 : 200 |
| | | | | | | 2.000 : 2.000 | — | — |

| | | | | | | | | |
|----------|---------------|-------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-------------|---------------|
| 43 | 100 : 500 | — | — | 25 : 25 | 25 : 50 | 200 : 200 | — | — |
| 44 | — | — | — | — | — | 0 : 25 | 100 : 200 | — |
| 45 | 200 : 500 | — | — | — | — | 50 : 100 | — | — |
| 46 | 200 : 200 | 100 : 100 | — | — | — | 100 : 200 | 200 : 500 | — |
| 47 | — | 200 : 1.000 | — | — | — | — | 100 : 500 | — |
| 48 | 100 : 100 | — | — | — | 100 : 200 | 2 000 : 2.000 | — | — |
| 49 | — | — | 100 : 500 | — | — | — | 200 : 500 | — |
| 50 | 200 : 200 | — | — | 0 : 50 | — | 0 : 200 | — | 0 : 50 |
| 51 | 2.000 : 2.000 | 25 : 25 | — | — | — | 1.000 : 2.000 | 500 : 1.200 | 0 : 25 |
| 52 | 100 : 200 | — | 25 : 25 | — | 0 : 50 | — | — | — |
| 53 | 0 : 25 | 50 : 50 | 25 : 50 | 25 : 25 | 400 : 500 | 400 : 500 | — | — |
| 55 | 1.000 : 2.000 | 200 : 500 | — | 50 : 50 | — | 25 : 25 | — | 25 : 25 |
| 56 | — | — | — | 500 : 1.000 | — | — | — | — |
| 57 | 0 : 25 | 25 : 100 | — | 500 : 1.000 | 0 : 100 | 400 : 400 | — | — |
| 59 | 25 : 25 | 100 : 200 | — | — | 0 : 50 | — | — | — |
| 63 | — | 0 : 25 | — | — | 50 : 100 | — | — | — |
| 64 | 500 : 1.000 | 200 : 1.000 | 200 : 200 | 500 : 500 | 100 : 500 | 2.000 : 2.000 | 25 : 25 | 25 : 200 |
| 65 | 0 : 100 | — | — | — | — | 1.000 : 2.000 | 50 : 100 | 2.000 : 2.000 |
| 66 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 67 | 1.000 : 1.000 | 25 : 200 | — | — | — | 50 : 50 | — | — |
| 69 | 1.000 : 2.000 | 0 : 200 | — | 0 : 25 | 0 : 50 | 25 : 25 | 0 : 50 | — |
| 70 | 1.000 : 1.000 | — | — | — | — | — | — | — |
| 71 | 200 : 1.000 | 500 : 500 | — | — | — | — | — | — |
| 72 | 100 : 200 | — | — | 400 : 500 | 0 : 25 | — | 50 : 200 | 50 : 100 |
| 73 | 0 : 200 | — | — | — | — | 200 : 200 | — | — |
| 75 | 0 : 500 | 0 : 50 | — | 1.000 : 1.000 | — | — | — | 25 : 25 |
| 77 | 50 : 200 | — | 25 : 50 | 50 : 100 | — | 500 : 500 | — | — |
| 78 | — | — | 50 : 200 | — | — | 200 : 1.000 | 0 : 50 | 0 : 50 |
| 79 | 0 : 500 | — | — | — | — | 1.000 : 2.000 | — | — |
| 80 | 0 : 200 | 100 : 200 | — | 50 : 50 | — | 25 : 25 | 25 : 25 | 0 : 50 |
| Anglaise | — | — | — | — | — | 200 : 500 | 0 : 50 | 0 : 200 |

Le premier chiffre indique le taux de l'agglutination après quatre heures à l'échelle à 37°; le second, après quinze à vingt-quatre heures à la température du laboratoire.

Le tableau III rend compte des différences extrêmes qu'il est possible de constater dans l'agglutinabilité des différentes souches.

TABLEAU III. — Variations
dans l'agglutinabilité des différentes souches

| SOUCHES | SÉRUM 2 | SÉRUM 3 | SÉRUM 6 | SÉRUM 51 | SÉRUM 40 | SÉRUM (Anglais) | SÉRUM 8 | SÉRUM 15 | SÉRUM 21 | SÉRUM 34 | SÉRUM 56 | SÉRUM 59 | SÉRUM 69 | SÉRUM 78 | SÉRUM 79 | SÉRUM 80 |
|---------|---------|---------|---------|----------|----------|-----------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 13 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 32 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 56 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 64 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

Mais ce tableau va nous permettre de faire d'autres constatations particulièrement intéressantes. Nous y avons cité à dessein les souches 2, 8, 15, 56, qui ne sont agglutinées que par le sérum homologue. Sur les 60 souches étudiées, nous n'avons trouvé que ces 4 souches qui fussent complètement différentes au point de vue sérologique. Mais les sérums préparés avec ces souches se sont montrés susceptibles de provoquer l'agglutination d'autres souches microbiennes, dont les sérums homologues étaient restés sans action sur ces 4 types nettement définis. Le tableau IV permet de préciser les faits.

TABLEAU IV.

| SÉRUMS | NOMBRE TOTAL de souches agglutinées | NOMBRE de souches agglutinées au 1/1.000 + | NOMBRE de souches agglutinées de 1/500 à 1/1.000 | NOMBRE de souches agglutinées de 1/100 à 1/500 | NOMBRE de souches agglutinées au-dessous de 1/100 |
|-------------------------------------|--|--|--|--|---|
| Sérum préparé avec la souche 2 . . | 49 | 0 | 6 | 6 | 7 |
| Sérum préparé avec la souche 8 . . | 25 | 1 | 12 | 14 | 8 |
| Sérum préparé avec la souche 15 . . | 22 | 12 | 3 | 5 | 12 |
| Sérum préparé avec la souche 56 . . | 21 | 1 | 3 | 4 | 13 |

TABLE V.

| SOUCHES agglutinées par les sérums 2 et 8 | | TAUX d'agglutination du sérum 2 | | TAUX d'agglutination du sérum 8 | | SOUCHES agglutinées par les sérums 2 et 15 | | TAUX d'agglutination du sérum 2 | | TAUX d'agglutination du sérum 15 | | SOUCHES agglutinées par les sérums 2 et 56 | | TAUX d'agglutination du sérum 2 | | TAUX d'agglutination du sérum 56 | | Total des souches agglutinées par les sérums 2 et 8 = 12. |
|---|---------------|---------------------------------|----|---------------------------------|-------------|--|---------------|---------------------------------|-------------|----------------------------------|-------------|--|---------------|---------------------------------|---------------|----------------------------------|-----------|--|
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 200 : 500 | 100 : 500 | 4 | 260 : 500 | 500 : 1.000 | 1 | 200 : 500 | 200 : 500 | 100 : 200 | 100 : 200 | 100 : 200 | 1 | 200 : 500 | 200 : 500 | 100 : 200 | 100 : 200 | 100 : 200 | Total des souches agglutinées par les sérums 2 et 56 = 12. |
| 13 | 56 : 500 | 400 : 50 | 13 | 50 : 500 | 200 : 1.000 | 13 | 50 : 500 | 200 : 1.000 | 500 : 1.000 | 500 : 1.000 | 500 : 1.000 | 13 | 50 : 500 | 50 : 500 | 500 : 1.000 | 500 : 1.000 | | |
| 46 | 0 : 100 | 400 : 500 | 46 | 0 : 400 | 200 : 200 | 46 | 0 : 400 | 200 : 200 | 200 : 200 | 200 : 200 | 200 : 200 | 46 | 0 : 100 | 0 : 100 | 50 : 400 | 50 : 400 | | |
| 24 | 25 : 25 | 200 : 1.000 | 17 | 50 : 1.000 | 25 : 25 | 17 | 50 : 1.000 | 25 : 25 | 25 : 25 | 25 : 25 | 25 : 25 | 24 | 0 : 25 | 0 : 25 | 50 : 400 | 50 : 400 | | |
| 39 | 25 : 25 | 0 : 25 | 24 | 25 : 25 | 0 : 25 | 24 | 25 : 25 | 0 : 25 | 0 : 25 | 0 : 25 | 0 : 25 | 39 | 0 : 25 | 0 : 25 | 0 : 30 | 0 : 30 | | |
| 46 | 0 : 25 | 100 : 400 | 27 | 25 : 1.000 | 0 : 25 | 27 | 25 : 1.000 | 0 : 25 | 0 : 25 | 0 : 25 | 0 : 25 | 46 | 200 : 1.000 | 200 : 1.000 | 0 : 50 | 0 : 50 | | |
| 53 | 0 : 25 | 50 : 50 | 29 | 25 : 25 | 0 : 25 | 29 | 25 : 25 | 0 : 25 | 0 : 25 | 0 : 25 | 0 : 25 | 53 | 0 : 25 | 0 : 25 | 25 : 25 | 25 : 25 | | |
| 57 | 0 : 25 | 25 : 400 | 39 | 25 : 25 | 25 : 50 | 39 | 25 : 25 | 25 : 50 | 25 : 50 | 25 : 50 | 25 : 50 | 57 | 0 : 25 | 0 : 25 | 500 : 1.000 | 500 : 1.000 | | |
| 63 | 400 : 500 | 0 : 25 | 40 | 0 : 25 | 0 : 100 | 40 | 0 : 25 | 0 : 100 | 0 : 100 | 0 : 100 | 0 : 100 | 63 | 4.000 : 1.000 | 4.000 : 1.000 | 500 : 500 | 500 : 500 | | |
| 64 | 1.000 : 1.000 | 200 : 1.000 | 50 | 200 : 1.000 | 100 : 500 | 50 | 200 : 1.000 | 100 : 500 | 100 : 500 | 100 : 500 | 100 : 500 | 64 | 400 : 200 | 400 : 200 | 4.000 : 1.000 | 4.000 : 1.000 | | |
| 67 | 100 : 200 | 25 : 200 | 52 | 0 : 25 | 25 : 25 | 52 | 0 : 25 | 25 : 25 | 25 : 25 | 25 : 25 | 25 : 25 | 67 | 25 : 400 | 25 : 400 | 50 : 100 | 50 : 100 | | |
| 75 | 100 : 100 | 0 : 50 | 53 | 0 : 25 | 25 : 50 | 53 | 0 : 25 | 25 : 50 | 25 : 50 | 25 : 50 | 25 : 50 | 75 | 400 : 400 | 400 : 400 | | | | |
| | | | 64 | 1.000 : 1.000 | 200 : 200 | 64 | 1.000 : 1.000 | 200 : 200 | 200 : 200 | 200 : 200 | 200 : 200 | | | | | | | |
| | | | 75 | 100 : 400 | 25 : 50 | 75 | 100 : 400 | 25 : 50 | 25 : 50 | 25 : 50 | 25 : 50 | | | | | | | |
| | | | 77 | 0 : 500 | 50 : 200 | 77 | 0 : 500 | 50 : 200 | 50 : 200 | 50 : 200 | 50 : 200 | | | | | | | |

Il ressort donc de nos recherches que, d'une part, en ce qui concerne la souche étudiée, son agglutinabilité peut être très variable, certaines souches étant agglutinées par tous les sérums, d'autres par le seul sérum homologue; d'autre part, pour ce qui est d'un sérum agglutinant préparé avec une souche quelconque de *B. perfringens*, on note la même irrégularité; c'est ainsi qu'en prenant comme antigène une souche agglutinée seulement par le sérum homologue, on obtient un sérum agglutinant qui est actif non seulement vis-à-vis de cette souche, mais encore vis-à-vis d'autres.

Preons un exemple pour chacun de ces quatre sérums. La souche 8 est agglutinée seulement par le sérum homologue, mais le sérum agglutinant, préparé avec cette souche, agglutine à des titres divers les souches suivantes qui sont agglutinées en même temps par le sérum 2 (souche Lechien du laboratoire de M. Weinberg).

CONCLUSIONS. — Parmi les 60 souches de *B. perfringens* étudiées, nous avons trouvé 4 souches nettement différentes au point de vue sérologique, agglutinées seulement par le sérum homologue. Il existe cependant entre toutes ces souches une parenté évidente, car un sérum préparé avec une souche agglutinée seulement par le sérum homologue est susceptible d'agglutiner, à des taux variables, d'autres souches de *B. perfringens*.

C. — ÉTUDE COMPARATIVE DES TYPES SÉROLOGIQUES ET DES TYPES BIOCHIMIQUES DU *B. perfringens*.

Simonds (1915) avait classé les types du *B. perfringens* selon leur pouvoir fermentaire vis-à-vis de l'inuline et de la glycérine en 4 groupes.

GRUPE I. — Les souches de ce groupe font fermenter la glycérine et l'inuline. Il n'y a pas de formation de spores; elles produisent de fortes hémolysines et sont pathogènes pour le cobaye.

GRUPE II. — Les souches de ce groupe font fermenter seule-

ment la glycérine. Elles ne produisent de spores que dans l'inuline.

GRouPE III. — Les souches de ce groupe font fermenter l'inuline seule et ne produisent de spores que dans la glycérine.

GRouPE IV. — Les souches de ce groupe ne font fermenter ni la glycérine, ni l'inuline, et produisent des spores dans la glycérine et l'inuline.

Sur 20 souches étudiées, Simonds a constaté que 4 (20 p. 100) attaquent la glycérine et l'inuline, 7 (35 p. 100) font fermenter la glycérine seule, 5 (25 p. 100) l'inuline seule et 4 (20 p. 100) restent inactives. Ainsi les plus grands pourcentages reviennent pour lui aux souches attaquant seulement la glycérine.

Ouranoff (1917) a trouvé que toutes les souches avec lesquelles il a expérimenté, et qui provenaient d'infections ou de blessures diverses, possédaient un pouvoir hémolytique. Selon la souche, la force du pouvoir hémolytique varie, et il prétend qu'une souche peut même perdre cette propriété pendant un certain temps, puis la reprendre. Simonds n'a pas cherché à définir le pouvoir hémolytique pour tous les groupes, mais les souches dont il a cherché le pouvoir ne se sont pas toutes montrées hémolytiques.

Plus récemment, Morton Kahn (1925), dans une étude comparative des souches de *B. perfringens* isolées dans des cas d'anémie pernicieuse, constate que le *B. perfringens* est toujours présent dans cette maladie en grande quantité. Pour 24 souches de *B. perfringens* isolées dans 24 cas d'anémie pernicieuse, il rapporte que, selon la classification biochimique de Simonds, 12 (50 p. 100) appartenaient au groupe I, 2 (8 p. 100) au groupe II, 4 (16 p. 100) au groupe III et 6 (25 p. 100) au groupe IV. Toutes ces souches se sont montrées plus ou moins hémolytiques. Cependant il n'a trouvé aucune relation entre l'activité hémolytique et le pouvoir pathogène, ni entre le pouvoir hémolytique et les groupes biochimiques, ni entre les groupes biochimiques et le pouvoir pathogène.

Nous avons voulu rechercher s'il existait un rapport entre les types biochimiques et les types sérologiques de *B. perfringens*.

Nous avons étudié 60 souches de *B. perfringens* de diverses provenances, au point de vue de leur réaction fermentaire sur l'inuline et la glycérine, opérant avec la technique suivante :

TECHNIQUE. — *Milieux de culture* : Nous avonsensemencé nos cultures dans le bouillon simple non sucré + 2 p. 100 d'inuline ou de glycérine. Nous n'avons pas fait le vide, car les ensemencements ont été faits dans des tubes de bouillon profonds fraîchement régénérés et ensemencés à chaud. Chaque souche a été ensemencée également dans un tube de bouillon simple non sucré qui a servi de témoin.

MÉTHODE DE TITRAGE DE L'ACIDITÉ. — Après soixante-douze heures à l'étuve à 37° les cultures ont été titrées avec la soude normale, en employant la phénolphtaléine comme indicateur. Opérant sur 20 cent. cubes de culture, nous avons pris comme résultat le nombre de centimètres cubes de soude normale nécessaire pour neutraliser 100 cent. cubes de culture. Les cultures en bouillon simple ont été titrées tout d'abord, puis nous avons titré les cultures en bouillon + inuline et celles en bouillon + glycérine. Les cultures en milieu sucré, dont le titre d'acidité était plus élevé que celui des cultures en bouillon simple, indiquaient que le sucre avait été touché, soit l'inuline, soit la glycérine. Nous n'avons compté comme ayant présenté une fermentation que les cultures montrant une augmentation de l'acidité supérieure de 15 p. 100 à celle du tube témoin.

RÉSULTATS. — Sur les 60 souches que nous avons étudiées, 6 souches ont attaqué seulement l'inuline, 17 seulement la glycérine, 26 la glycérine et l'inuline, et 11 se sont montrées tout à fait inactives vis-à-vis de ces deux hydrates de carbone. Les résultats que nous avons obtenus ne diffèrent pas beaucoup de ceux rapportés par Simonds et par Kahn, comme le montre le tableau VI.

Ainsi les plus grands pourcentages reviennent, pour Kahn et pour nous, aux souches attaquant à la fois l'inuline et la glycérine, et, pour Simonds, à celles attaquant seulement la glycérine.

Voyons maintenant comment se comportent les souches

rentrant dans chacune de ces catégories, vis-à-vis des 15 sérums agglutinants anti-*perfringens* que nous avons préparés avec des souches sérologiquement différentes.

TABLEAU VI.

| AUTEURS | NOMBRE DE SOUCHES | NOMBRE DE SOUCHES faisant fermenter le bouillon + inuline | POURCENTAGE | NOMBRE DE SOUCHES faisant fermenter le bouillon + glycérine | POURCENTAGE | NOMBRE DE SOUCHES faisant fermenter l'inuline et la glycérine | POURCENTAGE | NOMBRE DE SOUCHES n'attaquant ni l'inuline ni la glycérine | POURCENTAGE |
|--------------------------|-------------------|---|-------------|---|-------------|---|-------------|--|-------------|
| <i>Simonds</i> | 20 | 5 | 25 | 7 | 35 | 4 | 20 | 4 | 20 |
| <i>Kahn</i> | 24 | 4 | 16 | 2 | 8 | 12 | 50 | 6 | 25 |
| <i>Howard</i> | 60 | 6 | 10 | 17 | 28 | 26 | 43 | 11 | 18 |

TABLEAU VII. — Souches attaquant l'inuline seule.

| SOUCHE | SÉRUMS AGGLUTINANTS | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---------------------|---|---|----|----|-------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|----|----|
| | 2 | 3 | 6 | 51 | 10 | Angl. | 8 | 15 | 21 | 34 | 56 | 59 | 69 | 78 | 79 | 80 |
| 8 | — | — | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 9 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 33 | — | — | — | ++ | — | — | ++ | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 17 | + | — | — | — | — | +++ | — | + | — | — | — | ? | ? | +++ | — | — |
| 38 | + | — | ? | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | + |
| 40 | ? | ? | ? | — | + | + | + | ? | — | + | ? | — | +++ | +++ | — | + |

Le point d'interrogation indique une agglutination très faible au bout de vingt-quatre heures seulement.

Nous voyons que par exemple pour les souches attaquant l'inuline seule (tableau VII), sur 6 souches, 3 sont agglutinées plus ou moins légèrement par le sérum 8, préparé avec la souche attaquant seulement l'inuline. Mais de ces 3 souches l'une (8) n'est agglutinée que par le sérum homologue, une deuxième (33) est également agglutinée par le sérum 51 préparé avec la souche attaquant à la fois la glycérine et l'inuline, et par le sérum 80 préparé avec une souche qui n'attaque ni la glycérine, ni l'inuline. L'étude des autres tableaux (VII et VIII) nous

confirme qu'il n'existe aucun rapport entre les souches biochimiques et les souches sérologiques puisque la souche attaquant seulement l'inuline est fortement agglutinée par un sérum préparé avec un *B. perfringens* qui n'attaque pas du tout l'inuline.

TABLEAU VIII. — Souches n'attaquant ni la glycérine ni l'inuline.

| SOUCHE | SÉRUMS AGGLUTINANTS | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------------------|----|----|----|----|-------|----|-----|-----|----|-----|-----|----|----|-----|----|
| | 2 | 3 | 6 | 51 | 10 | Angl. | 8 | 15 | 21 | 34 | 56 | 59 | 69 | 78 | 79 | 80 |
| 1 | ++ | ++ | + | ++ | ++ | + | + | +++ | +++ | ++ | + | + | ++ | + | ++ | + |
| 24 | — | ? | ? | ++ | ? | — | ++ | ? | — | — | — | +++ | ? | — | — | ? |
| 39 | + | ? | — | ? | — | + | ? | + | + | — | — | — | ? | + | — | ? |
| 49 | — | — | — | ++ | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | ? |
| 56 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | +++ | — | + | — | — | — |
| 73 | — | ? | — | — | + | — | — | — | — | — | +++ | — | ? | — | — | + |
| 79 | — | — | ? | — | ? | — | — | — | — | — | — | — | ? | + | +++ | + |
| 80 | — | — | — | + | — | + | + | + | + | + | + | + | ? | ++ | ++ | ++ |
| Anglaise. | — | — | ++ | ? | ? | +++ | — | — | — | — | — | + | — | ? | — | — |

Le point d'interrogation indique une agglutination très faible au bout de vingt-quatre heures seulement.

Le point d'interrogation indique une agglutination très faible au bout de vingt-quatre heures seulement.

La conclusion de cette seconde partie de nos recherches est qu'il n'existe aucune parenté entre les types biochimiques et les types sérologiques du *B. perfringens*.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREWS (F. W.), Studies in Group Agglutination. *Journ. Path. and Bact.* (Cambridge), **25**, 1922, p. 505.
- ARKWRIGHT (J. A.), Variation in Agglutination in Bacteria. *Journ. Path. and Bact.*, **24**, 1921, p. 36.
- BORDET (J.) et SLEESWYK, Sérodiagnostic et variabilité des microbes suivant le milieu de culture. *Ces Annales*, **24**, 1910, p. 476.
- BULL, Toxins of Strains of *B. Welchii*. *Journ. Exper. Med.*, **26**, 1917, p. 867.
- DAVESNE (J.), Action favorable des injections de peptone de sang et de sérum sur le développement du pouvoir agglutinant du sérum. *C. R. Soc. biol.*, **97**, 1927, p. 1061.
- FARRY (P.), Sur l'agglutinabilité des microbes atténués. *C. R. Soc. biol.*, **83**, 1920, p. 201.
- FÉLIX et ROBERTSON, Qualitative analysis of the Bacterial Antigens of *Vibrio septique* and *B. Tetani*. *Br. Jour. Exper. Path.*, **9**, 1928, p. 6.

- GARDNER (A. D.) et WALKER (E.). Nature of serological differences exhibited by different cultures of a bacterial species. *Journ. of Hygiene*, **20**, 1921, p. 10.
- HERTER (C. A.). On Bacterial processes in the intestinal track in some cases of advanced anemia, with special reference of infection by *B. aerogenes capsulatus*. *Journ. Biol. Chem.*, **2**, 1906-1907, p. 1.
- HEWLETT (R. T.). Manual of Bacteriology, Clinical and Applied. 4th Edition, London, 1911.
- HOWARD (A.). Sur la préparation rapide des sérums agglutinants. *C. R. Soc. biol.*, **98**, 1928, p. 439.
- HOWARD (A.). Développement très rapide du pouvoir agglutinant chez les lapins hyperimmunisés par voie intraveineuse avec des corps microbiens. *C. R. Soc. biol.*, **98**, 1928, p. 493.
- KAHN (Morton C.). Comparative study of intestinal *B. Welchii*. Strains isolated from Pernicious anaemia. *Abstracts of Bact.*, 1928, p. 17.
- KAMIN (L.). Zur Aetiologie der Gasphegmone. *Centralbl. f. Bakt.*, I Abt., Orig., **35**, 1904, p. 554.
- KLEIN (E.). Further report on the *B. enteritidis Sporogenes*. *Annual Reports of the Med. Off. of the Local Gov. Board*, London, n° 28, 1898-1899, p. 312.
- NEGRE (L.) et RAYNAUD (M.). Sur l'agglutination des microbes immobiles par des sérums normaux. *Ces Annales*, **25**, 1911, p. 619.
- NICOLLE (Ch.). Suite d'expériences relatives au phénomène de l'agglutination des microbes. *Ces Annales*, 1904 et *Bull. Inst. Pasteur*, 1904, p. 542.
- PASSINI (F.). Variabilität der Bacterium und Agglutinations-phenomen. *Munch. med. Woch.*, **51**, 1904, p. 1283.
- PIC et LESIEUR. Contribution à la bactériologie du rhumatisme articulaire aigu. Nouvelles recherches sur le bacille d'Achalme retrouvé dans un cas de rhumatisme cérébral. *Journ. de phys. et de path. gén.*, **1**, 1899, p. 1007.
- PICCHI (L.). Contributo alla conoscenza del bacillo della gangrena gassosa di Fraenkel; *Sperimentale*, **61**, 1907, p. 173.
- ROCCHI (G.). Serodiagnostische Untersuchungen über die Wichtigsten anaëroben Buttersäuerkeime mit der Methode der Agglutination und der Komplementablung. *Centr. f. Bakt.*, I Abt, Orig., **60**, 1911, p. 579.
- SIMMONS (J. P.). Studies in *B. Welchii* with special reference to classification and its relation to diarrhea. *Monograph of the Rockefeller Inst. for Med. Research*, n° 3, septembre 1915.
- TSUKAHARA (I.). Verlauf der Agglutination bei. *Centr. Referate*, **73**, 1922.
- TULLOCH (W. J.). Mechanism of agglutination of Bacteria by specific sera. *Biochem. Journ.*, **8**, 1914, p. 293.
- WEINBERG (M.) et SEGUIN. *La Gangrène gazeuse*, Masson, 1918. Paris.
- WEINBERG (M.) et GINSBOURG. *Données récentes sur les microbes anaérobies et leur rôle en pathologie*, Masson, 1927, Paris.
- WERNER (G.). Die Agglutination bei Gasphegmone bazillen. *Arch. f. Hygiene*, **53**, 1905, p. 128.

PRÉPARATION DE L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE ET VÉRIFICATION DE SES PROPRIÉTÉS

par P. J. MOLONEY et M^{lle} C. J. FRASER,
des laboratoires Connaught, Toronto, Canada.

L'anatoxine diphtérique possède deux qualités essentielles, savoir : l'innocuité et le pouvoir antigénique. La technique utilisée pour la préparation et le contrôle de l'anatoxine doit avoir pour but de s'assurer que le produit obtenu possède bien ces deux qualités. La méthode de préparation est, dans ses grandes lignes, celle qui est préconisée par Ramon.

Nous obtenons d'abord notre toxine diphtérique de la manière suivante : une culture de bacille diphtérique (Park Williams, n° 8), nous ensemençons un bouillon (viande de veau infusée) déjà fermenté par du colibacille, et contenant 1 p. 100 de peptone du commerce et 0,1 p. 100 de glucose. Au bout de sept jours, cette culture en bouillon est clarifiée par son passage à travers une pâte de papier filtre ordinaire, puis filtrée de nouveau, cette fois à la bougie Berkefeld d'où elle passe dans un flacon d'une capacité de 20 litres. Des échantillons de cette toxine filtrée sont prélevés pour la détermination de sa toxicité et du pouvoir flocculant.

Le pouvoir flocculant d'une toxine fraîche est presque directement proportionnel à sa toxicité (MLD) quand l'antitoxine étalon sert à cette détermination. Pour qu'une toxine puisse servir à la préparation de l'anatoxine, elle doit contenir au moins 400 MLD ou 6 unités antigéniques au centimètre cube, déterminé par notre antitoxine étalon.

Pour chaque litre de toxine, nous ajoutons 0,3 à 0,4 p. 100 de formol, c'est-à-dire 3 à 4 cent. cubes de formaldéhyde du commerce à 40 p. 100. La quantité la plus convenable de formol est celle qui rend notre toxine inoffensive en quatre ou six semaines. Elle peut varier suivant les différentes toxines employées.

Aucun préservatif (phénol, crésol ou autre) n'est ajouté à la

toxine. La présence de phénol ou de crésol dans une toxine qui doit servir à la préparation de la toxine peut avoir deux conséquences : sa valeur antigénique peut diminuer de beaucoup, disparaître même, et le mélange peut se troubler.

La toxine ainsi traitée est mise à l'étuve jusqu'à ce que 0 c. c. 1 d'une solution au 1/10, injectée dans le derme d'un cobaye, ne produise aucune réaction après deux jours, et que, non diluée, la même quantité d'anatoxine donne une réaction ne dépassant pas 12 millimètres de diamètre. Cette première détermination de la toxicité est faite après deux semaines d'incubation à 37° C, et elle est ensuite répétée chaque semaine lorsque l'innocuité, mesurée par les épreuves intradermiques, est complète. On arrête l'incubation, l'anatoxine est passée à travers un filtre Seitz, et sa stérilité est alors éprouvée. Nous faisons par la suite une seconde vérification de l'innocuité par la méthode des injections intradermiques mentionnée plus haut.

Innocuité et valeur immunisante sont ensuite vérifiées par la méthode des injections sous-cutanées. Nous contrôlons la toxicité de notre produit en l'injectant, à la dose de 5 cent. cubes dans le tissu cellulaire sous-cutané. 6 cobayes pesant de 320 à 340 grammes subissent l'épreuve; 4 doivent rester bien portants pendant au moins un mois et aucun ne doit mourir d'intoxication diphtérique.

Pour nous assurer de sa valeur immunisante, 6 cobayes reçoivent en injection sous-cutanée 0 c. c. 5 d'anatoxine. Au bout d'un mois, ils subissent l'épreuve de Schick. Deux semaines plus tard, ils reçoivent tous une injection sous-cutanée de 5 MLD de toxine diphtérique. 5 d'entre eux au moins doivent survivre. L'épreuve de Schick fournit un premier témoignage et une confirmation de la valeur immunisante du produit.

On remplit aseptiquement des ampoules avec des quantités définies d'anatoxine. Finalement, l'on s'assure que le lot d'anatoxine mise en flacons au même moment est bien stérile et dénuée de toute toxicité. Dans ce but, on prélève au hasard quelques flacons provenant d'un même lot et on vérifie l'innocuité et la stérilité de leur contenu par les procédés ci-dessus indiqués. Les mêmes vérifications sont poursuivies pour chaque lot d'anatoxine préparé.

Nous ajoutons à chaque envoi d'anatoxine et à chaque nécessaire à la réaction de Schick une petite ampoule d'anatoxine diluée. Cette anatoxine diluée remplace la toxine chauffée, sert de témoin dans la réaction de Schick, et de plus, employée en injection intradermique, à la dose de 0 c. c. 1, elle nous permet de juger la sensibilité des individus vis-à-vis de l'anatoxine. Si, dans les trois jours qui suivent l'injection, aucune rougeur locale de plus de 10 millimètres de diamètre ne se manifeste, aucune réaction appréciable n'est à craindre par suite de l'administration de l'anatoxine. D'après les constatations faites jusqu'ici, les réactions déterminées par l'injection d'anatoxine diphtérique sont très rares chez les enfants de moins de huit ans. Chez les enfants plus âgés et chez les adultes, l'on peut rencontrer une réaction locale marquée, et parfois même générale. Une légère rougeur au point d'injection se manifeste chez 25 p. 100 des enfants de plus de huit ans, sans cependant produire de conséquences graves. Les réactions plus sévères, parfois rencontrées, consistent en une induration et rougeur locales s'étendant à plusieurs centimètres, accompagnées de malaise, maux de tête et de température. Ces symptômes disparaissent toutefois au bout de quelques jours.

L'anatoxine est diluée par addition d'eau physiologique. Le degré de dilution requis est évalué en comparant les réactions que provoque 0 c. c. 1 de différentes dilutions (1/20, 1/30, 1/40, 1/60), injecté dans le derme d'individus dont la sensibilité est connue, avec celle produite sur les mêmes sujets par 0 c. c. 1 d'anatoxine étalon diluée. La dilution convenable d'anatoxine est celle qui donne une réaction égale à celle produite par l'anatoxine étalon diluée. Celle-ci produit une rougeur de 10 à 20 millimètres de diamètre chez 50 p. 100 des adultes sensibles à l'anatoxine âgés de vingt à trente ans.

Au Canada, l'on emploie actuellement pour l'immunisation active d'un adulte ou d'un enfant trois doses d'anatoxine diphtérique, soit 0 c. c. 5, 0 c. c. 5, 1 cent. cube administrées à trois semaines d'intervalle.

Pour les sujets qui se sont montrés sensibles à l'injection de l'anatoxine diluée, nous recommandons des doses plus faibles. Le procédé suivant peut être recommandé pour l'immunisation de ces derniers; on leur administre par injections sous-cuta-

nées $1/50$ de centimètre cube d'anatoxine, c'est-à-dire $1/5$ de centimètre cube de la solution au $1/10$. Nous classifions les réactions résultantes en trois groupes savoir :

- a*) Rougeur de 20 millimètres au plus.
- b*) Rougeur de plus de 20 millimètres sans œdème.
- c*) Rougeur prononcée et œdème.

Aux sujets du groupe *a*, nous donnons trois injections de $1/10$ de centimètre cube d'anatoxine; à ceux du groupe *b*, trois injections de $1/50$ de centimètre cube; et à ceux du groupe *c*, trois injections de $1/100$ de centimètre cube. Un intervalle de trois semaines doit s'écouler après chaque injection.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES ET OBSERVATIONS CLINIQUES SUR L'ANATOXINE DIPHTÉRIQUE

par P. ZDRODOWSKI et C. HALIAPINE

(Institut de Microbiologie et d'Hygiène à Bakou.)

La possibilité de transformer les toxines en anatoxines est l'un des faits les plus saillants de l'immunologie contemporaine. Il n'est pas possible actuellement d'en apprécier toute l'importance, car les perspectives qu'a ouvertes le principe des anatoxines ne sont pas encore limitées. Mais cependant on peut dès maintenant essayer de mesurer le chemin parcouru.

Il est indispensable de remarquer tout d'abord que les travaux de Ramon ont établi, à la fois, le principe général et le procédé pratique de transformation des toxines en anatoxines : antigènes inoffensifs et immunisants; par cela même, ils ont créé la méthode rationnelle d'immunisation contre les différentes toxines, méthode à la fois efficace et sans dangers.

Appréciant l'importance exceptionnelle des découvertes de Ramon, notre Institut de Bakou a effectué, depuis plusieurs années déjà, des recherches systématiques en vue de l'étude des anatoxines dérivant de diverses toxines et, par analogie, de vaccins microbiens basés sur le même principe et issus de certains produits microbiens ou autres (toxines diphtérique, tétanique, streptococcique de Dick, ricine, mélithine, etc., produits de culture des bacilles dysentériques, cholérique et typhique).

Nous avons porté une attention toute spéciale à la question de l'anatoxine diphtérique; cette question a en effet un double intérêt, pratique d'abord, théorique ensuite, car elle offre le meilleur modèle pour l'étude du problème des anatoxines en général.

Dans ce mémoire, nous exposons les résultats sommaires de

notre étude sur l'anatoxine diphtérique, obtenus par nous de 1924 à 1928. Nous bornant à faire connaître les résultats principaux de recherches originales, nous nous abstenons de citer dans notre mémoire les données bibliographiques déjà nombreuses sur le même problème.

I. — PARTIE EXPÉRIMENTALE

DONNÉES GÉNÉRALES SUR L'ANATOXINE

a) Quelques remarques sur la transformation de la toxine diphtérique en anatoxine.

En concordance avec les données de Ramon, nos nombreuses observations ont montré que la toxine diphtérique peut être rendue complètement inoffensive par l'action combinée du formol et de la chaleur. Cette transformation de la toxine dépend de la concentration du formol, du degré de la température et de la durée de l'action réciproque de ces facteurs; dans des conditions comparables, la rapidité de la transformation sous l'influence des quantités variables de formol est en fonction de la température.

Il n'est pas également facile de rendre inoffensifs tous les échantillons de toxine diphtérique. En général, les toxines particulièrement riches en $\text{NH}/2$ se transforment plus difficilement. Ainsi, par exemple, les toxines contenant moins de 0,1 p. 100 de $\text{NH}/2$ (d'après la méthode de titrage Sørensen) deviennent inoffensives en utilisant la formule : 0,5 p. 100 formol \times 39° \times trente jours. Au contraire les toxines contenant plus de 1 p. 100 de $\text{NH}/2$, dans les mêmes conditions d'expérience, conservent ordinairement une certaine toxicité.

La transformation de la toxine, sous l'influence du formol et de la chaleur, est un procédé *irréversible*, c'est-à-dire la toxine transformée en son dérivé inoffensif ne peut retrouver son pouvoir toxique.

Sous l'influence du formol et de la chaleur, la toxine peut,

dans certaines conditions, perdre, en totalité ou en partie, son *pouvoir antigénique*. En général, cette destruction totale ou partielle dépend de la concentration du formol et de la température; si l'on augmente progressivement la quantité de formol et la chaleur, la diminution du pouvoir antigène est de plus en plus grande.

Cependant en employant une proportion convenable d'aldéhyde formique et une température optimum, on peut rendre la toxine inoffensive, et lui conserver son pouvoir antigène; on a alors l'*anatoxine*, c'est-à-dire une *préparation spécifique, entièrement inoffensive et conservant le pouvoir antigénique de la toxine*.

Évidemment, tout en se dégradant dans son pouvoir toxique, la toxine peut aussi perdre de sa valeur antigène, aussi peut-on obtenir des anatoxines de différentes qualités, c'est-à-dire ayant un pouvoir antigénique différent.

L'anatoxine idéale est celle dont le pouvoir antigène est intact.

Ainsi, la préparation de l'anatoxine ayant un pouvoir antigène non altéré est sous la dépendance d'un procédé permettant l'appréciation du pouvoir antigène de l'anatoxine. A ce procédé est lié tout le succès de l'emploi de l'anatoxine comme vaccin.

Envisageons donc de quelle manière peut s'effectuer cette appréciation de la valeur antigène de l'anatoxine.

b) L'appréciation des qualités immunisantes de l'anatoxine par la réaction de floculation.

Il semblerait que la méthode biologique pût résoudre de la façon la plus satisfaisante le problème de l'appréciation des propriétés vaccinales. L'expérimentation montre cependant que cette méthode biologique est *relative* par sa sensibilité, et qu'il est bien préférable d'utiliser la méthode de floculation de Ramon pour arriver au but cherché.

La méthode de Ramon nous permet de définir facilement et exactement, *in vitro*, la présence ou l'absence du pouvoir antigène dans l'anatoxine; *le pouvoir floculant est l'indice du*

pouvoir antigène. Les recherches montrent que pouvoir floculant et propriétés immunisantes évoluent parallèlement. La détermination du pouvoir floculant de l'anatoxine, comparativement à celui de la toxine originelle, nous donne la possibilité d'apprécier certaines qualités de l'anatoxine. Les expériences *in vitro* et *in vivo* permettent de se rendre compte que l'anatoxine « type » conserve entièrement le pouvoir floculant de la toxine originelle.

Ces données sur l'importance de la floculation pour la standardisation de l'anatoxine concordent bien avec des observations analogues de Ramon. Cependant, il faut remarquer que certains auteurs ne partagent pas cette opinion. Citons, par exemple, qu'à l'Institut de Vienne (directeur, professeur Kraus), on ne réussit à préparer ni des toxines ni des anatoxines donnant la réaction de floculation; néanmoins, d'après la communication verbale de Bächer les lots d'anatoxine ne floculant pas donnent de très bons résultats dans la vaccination.

Pour comprendre et bien apprécier précisément la signification réelle de la floculation et en même temps pour expliquer la cause des contradictions citées plus haut, il faut s'arrêter d'une façon plus détaillée sur l'analyse du phénomène de floculation en général.

c) Interprétation générale du phénomène de floculation.

Nous croyons qu'il faut essayer d'interpréter la réaction de floculation dans le mélange toxine-antitoxine, en la comparant avec les autres réactions d'immunité (r. d'agglutination, r. de précipitation). L'analyse expérimentale de la floculation effectuée dans cette direction confirme très bien ce point de vue.

En particulier, les observations montrent qu'on peut considérer le phénomène de floculation comme « la deuxième phase » de la réaction toxine-antitoxine, ceci étant entièrement analogue à ce qui se passe dans la deuxième phase d'agglutination, découverte en son temps par Bordet. Par analogie avec le phénomène d'agglutination, on peut ainsi différencier deux phases dans le phénomène de floculation : la première phase corres-

pendant à l'union de la toxine avec l'antitoxine, la deuxième phase se manifestant dans la floculation consécutive.

L'influence des électrolytes sur la marche de la floculation est comparable à la même action des électrolytes dans l'agglutination. Ainsi, nos observations (en collaboration avec le D^r Lourié) ont montré *qu'avec le floculat on peut reproduire des expériences tout à fait identiques au phénomène d'agglutination décrit par Bordet* : si l'on débarrasse le floculat des électrolytes qu'il contient par un lavage répété et si ensuite on dilue le floculat lavé et centrifugé, on peut observer la « défloculation », c'est-à-dire la dissolution du floculat (ceci, d'après la technique de Ramon).

Si l'on ajoute à cette solution du floculat dans l'eau distillée une quantité convenable de NaCl, on observe de nouveau « la floculation ». Les observations montrent que des électrolytes différents ne provoquent pas au même degré cette action précipitante. Ainsi dans les expériences de Lourié faites dans des conditions comparables, NaCl provoque plus rapidement la « floculation secondaire » ; NH_4Cl plus lentement, etc.

Autrement dit, dans les expériences citées, on observe des faits répondant au classement des électrolytes d'après Hoffmeister.

Si la floculation apparaît seulement comme la deuxième phase de la réaction toxine-antitoxine, elle peut évidemment, sous l'influence des différents facteurs, subir quelques variations. *En particulier, les propriétés individuelles respectives du sérum et de la toxine, leur concentration réciproque, la présence de tel ou tel électrolyte dans le mélange, la réaction du milieu, la température, etc., peuvent avoir une influence sur le phénomène de floculation.* Le phénomène s'apparente aux phénomènes colloïdaux et peut se manifester alors suivant un certain « optimum ». Si les conditions de cet optimum changent, l'apparition normale de la floculation peut être changée ou même disparaître.

Dans le cas où la floculation disparaît, la réaction est limitée à l'action réciproque de la toxine et de l'antitoxine.

Les observations montrent que, toutes conditions égales, *l'apparition de floculation peut dépendre entièrement de l'état de la toxine.* Il suffit, par exemple, de soumettre la toxine à

l'action du soleil pour abaisser très nettement la vitesse de sa floculation initiale. La présence de l'acide phénique prive plus ou moins complètement la toxine de son pouvoir floculant. Quelques toxines en mélange avec l'antitoxine ne présentent de phénomène de floculation, ce qui dépend évidemment du mode de leur préparation. Par analogie, avec les races de bactéries non agglutinantes, qui absorbent les agglutinines sans qu'il y ait apparition d'agglutination, les toxines non floculantes donnent seulement la première phase de réaction avec l'antitoxine, mais non la deuxième.

Quelle déduction tirer de tout ceci...

Si l'on peut préparer les toxines dépourvues de pouvoir floculant, il est évident alors que les anatoxines préparées avec ces toxines ne donneront pas non plus de floculation et pourtant pourront se montrer immunisantes.

Il n'y a pas, dans ce cas, contradiction avec notre affirmation de l'importance de la floculation comme indice du pouvoir immunisant des anatoxines préparées avec des toxines floculantes. Ceci ne diminue en rien non plus la haute valeur de la méthode de Ramon. *La production de toxines floculantes réussit très régulièrement si l'on emploie une méthode convenable, par exemple, la méthode de l'Institut Pasteur.* Il est évident, aussi, que *l'emploi des toxines non floculantes n'est pas rationnel*, parce que dans ce cas l'expérimentateur est privé d'une méthode simple et exacte pour apprécier directement la valeur de l'anatoxine; il est alors obligé d'employer les autres méthodes (biologiques) moins exactes et plus compliquées pour apprécier d'une façon toute relative la valeur du produit que l'addition de phénol par exemple empêche de floculer.

Les variations de la toxine sont très nettement indiquées par celles du pouvoir floculant. Ainsi, nous pouvons être avertis de l'altération de l'antigène, par un changement dans la vitesse de floculation (avidité). *De là l'importance particulière de la vitesse de floculation pour l'appréciation de la valeur de l'anatoxine.*

d) De la vitesse ou avidité de floculation.
Sa caractéristique.

Nos observations ont montré que l'avidité de la floculation qu'on observe dans le mélange de la toxine (ou d'anatoxine) et d'antitoxine présente un phénomène original et autonome. Cette avidité peut dépendre soit du sérum, soit des propriétés de la toxine (ou de l'anatoxine); elle ne dépend, comme Ramon l'avait déjà indiqué, ni de la quantité d'unités antitoxiques, ni de la quantité d'unités antigéniques de la toxine ou de l'anatoxine.

En ce qui concerne la toxine et l'anatoxine, l'indépendance de leur avidité de floculation peut se démontrer très aisément.

Les changements de l'avidité de floculation de l'anatoxine ne se font pas par hasard, ils *sont soumis à des règles déterminées*. Étudiant cette question, nous avons été rapidement convaincus, en particulier, qu'une concentration de formol supérieure à 0,5 p. 100 et une température plus élevée que 40° diminuent l'avidité de floculation de l'anatoxine. Au contraire, en employant des quantités optima de formol et de température, on peut préparer régulièrement des anatoxines qui conservent l'avidité de la toxine originelle.

Naturellement, ce n'est pas par hasard que l'avidité de floculation s'abaisse, si l'on utilise une plus grande quantité de formol ou une température plus élevée.

Cette diminution de l'avidité de la floculation traduit une certaine dénaturation de l'anatoxine, d'où l'importance de la réaction de floculation pour l'appréciation de la valeur de l'anatoxine.

Les résultats de la vaccination des enfants par petites doses (2 unités antigéniques à 3 unités 5) d'anatoxines ayant une avidité différente, d'après la floculation, confirment entièrement ce qui vient d'être dit.

Ainsi, en vaccinant 622 enfants par une anatoxine ayant conservé complètement l'avidité de la toxine originelle, nous eûmes de 92,3 à 96 p. 100 de Schicks négatifs dans un espace de temps de trois, quatre semaines à deux mois et demi. Paral-

lèlement, la vaccination de 553 enfants par une anatoxine qui avait manifesté un retard dans la vitesse de floculation donna dans les mêmes conditions 83,4 p. 100 de Schicks négatifs dans un espace de temps de deux à quatre mois.

e) Supériorité de la méthode de floculation
sur la méthode biologique
pour l'appréciation de la valeur de l'anatoxine.

Comme nous l'avons indiqué plus haut la *méthode biologique est moins sensible pour apprécier la valeur de l'anatoxine que la méthode de floculation de Ramon*. Nous sommes arrivés à cette conclusion en employant parallèlement les deux méthodes vis-à-vis de deux anatoxines, dont les propriétés immunisantes furent établies à l'avance par des essais d'immunisation sur un nombre important d'enfants.

L'anatoxine X (7 unités) immunisait 98,4 p. 100 des enfants avec 0 c. c. 5, cela en l'espace de trois ou quatre semaines à deux mois et demi.

L'anatoxine III (7 unités) dans un autre groupe, dans des conditions identiques de vaccination, ne donnait que 72,1 p. 100 d'immunisés en l'espace de deux mois et demi.

L'anatoxine X, très active, ne *manifestait pas de retard de floculation* par rapport à la toxine originelle, tandis que l'anatoxine III, moins active, flocculait avec un retard de cinq heures.

Avec chacune de ces deux anatoxines, nous avons immunisé plusieurs séries de cobayes, soit par une vaccination unique avec des doses allant de 5 cent. cubes à 0 c. c. 5, soit par deux injections à six jours d'intervalle avec les doses suivantes : 0,2-0,3-0,005-0,05-0,0125-0,025.

Éprouant plus tard ces cobayes à l'aide de l'épreuve de Schick, nous avons obtenu les résultats suivants : dans les expériences d'immunisation par vaccination unique, avec des doses allant jusqu'à 0 c. c. 2 et dans les expériences à l'aide de la vaccination double jusqu'à des doses de 0 c.c. 1-0 c.c. 2, il était impossible de mettre en évidence une différence entre les deux anatoxines. Par deux expériences de vaccination avec des doses moindres, nous n'avons pas réussi à noter une diffé-

rence quelconque entre les anatoxines, parce que dans ce dernier cas l'épreuve de Schick chez les animaux donne des résultats irréguliers.

Ainsi deux séries d'anatoxine, différentes sans aucun doute, d'après les données d'immunisation chez les enfants et nettement distinguées, par ailleurs, par la méthode de floculation (d'après l'avidité), ne peuvent être différenciées par la méthode biologique.

La sensibilité très relative de la méthode biologique peut s'expliquer de la façon suivante. Dans l'immunisation avec les grosses doses des deux anatoxines, on ne peut pas découvrir de différences parce que celles-ci sont masquées par l'hyperimmunisation. Quant aux petites doses, elles ne peuvent différencier la qualité différente des deux anatoxines parce que dans ces conditions d'immunisation minime le facteur d'individualité des animaux l'emporte, ce qui enlève aux résultats leur régularité.

f) Appréciation de la valeur de l'anatoxine diphtérique par la méthode de floculation.

Le pouvoir vaccinant de l'anatoxine dépend de la quantité d'unités antigéniques dans 1 cent. cube de cette anatoxine et de sa qualité. *De là, il s'ensuit que la méthode de titrage de l'anatoxine comme vaccin doit être double : quantitative et qualitative. Cette double appréciation de l'anatoxine se réalise en même temps par la méthode de Ramon ; la quantité d'unités antitoxiques qui provoque la floculation initiale dans 1 cent. cube d'anatoxine donne la valeur de cette anatoxine.*

L'anatoxine « normale » est celle qui conserve entièrement l'avidité de floculation de la toxine originelle. De tels échantillons d'anatoxine normale doivent être recommandés pour la vaccination de l'homme.

g) Méthode de préparation des anatoxines actives.

Par de très nombreuses vaccinations, chez les enfants, nous avons pu déterminer à quelles caractéristiques doivent répon-

dre les échantillons d'anatoxine utilisés dans l'immunisation active de l'homme. Dans des recherches spéciales, nous avons étudié la question de la méthode de préparation d'une anatoxine active. Nous résumerons ici le résultat de ces recherches.

Etant donné les variations de composition des différents lots de toxine, il n'est guère possible de fixer une technique immuable. On ne peut qu'indiquer approximativement la quantité de formol à ajouter à la toxine, ainsi que la température que doit subir la toxine formolée et le temps de séjour à l'étuve.

En général, on ne doit pas ajouter à la toxine une quantité de formol supérieure à 5 cent. cubes (de la solution commerciale à 35 p. 100) par litre de toxine ; la température d'exposition ne doit pas être plus élevée que 40°, et le temps de séjour à cette température doit être d'environ un mois.

Nous employons, dans la pratique courante, pour la préparation des anatoxines la formule suivante : 0,5 p. 100, formol + 39° + trente jours, et alors, nos anatoxines préparées d'après cette méthode conservent en général (80 p. 100) l'avidité de la floculation des toxines originelles. Pour la vaccination des hommes, nous employons toujours seulement les anatoxines, qui conservent complètement l'avidité de la floculation des toxines originelles (1).

II. — PARTIE CLINIQUE

Immunisation des enfants par l'anatoxine diphtérique. (Observations cliniques).

Pendant la saison d'hiver 1925-1926, dans la ville de Bakou et aussi dans la province, nous avons organisé une campagne antidiphtérique en utilisant la vaccination par l'anatoxine diphtérique. Environ 30.000 personnes (dans ce nombre 27.000 enfants de Bakou) ont subi l'épreuve préliminaire de Schick (4/40 de la dose minima mortelle pour le cobaye). La

(1) La toxine utilisée pour la préparation de l'anatoxine ne doit pas contenir plus de 0,1 p. 100 d'N H² titrée d'après la méthode de Soerausen.

plupart des enfants étaient des écoliers âgés de sept à quatorze ans.

Chez les enfants de Bakou, la réaction de Schick était positive chez 19 p. 100 d'entre eux.

En tenant compte de l'âge, nous avons pu faire les constatations suivantes : à trois mois, 5 p. 100 ; de quatre à six mois, 24,6 p. 100 ; de sept à douze mois, 36,8 p. 100 ; de un à trois ans, 60,5 p. 100 ; de quatre à six ans, 42,5 p. 100 ; de sept à douze ans, 22,1 p. 100 ; de onze à quatorze ans, 13,5 p. 100 de Schicks positifs.

Environ 4.600 personnes à réaction positive subirent la vaccination par l'anatoxine diphtérique. Par la suite, l'effet de la vaccination fut contrôlé par de nouvelles réactions de Schick chez 2.000 sujets environ.

Grâce à une comptabilité très sévère des enfants vaccinés, et aussi à la bonne organisation municipale de la statistique de la diphtérie à Bakou au cours des deux années suivantes (1926-1928), il nous a été possible d'obtenir des renseignements exacts sur la morbidité diphtérique parmi les sujets vaccinés et les non vaccinés.

Ainsi, nous avons pu évaluer les résultats de l'immunisation, même au point de vue épidémiologique.

D'un autre côté, de nouvelles épreuves de Schick pratiquées au bout de deux ans nous ont permis d'apprécier par la méthode expérimentale la durée relative d'immunité après la vaccination avec l'anatoxine.

Caractéristiques de l'anatoxine utilisée dans les essais de vaccination antidiphtérique.

Pour la vaccination des enfants, nous avons employé des lots d'anatoxine préparés avec des toxines dont les caractéristiques étaient les suivantes :

Les toxines étaient préparées d'après la méthode de l'Institut Pasteur et contenaient de 7 à 9 unités antigéniques par centimètre cube ; leur pH oscillait de 8,1 à 8,3 ; les toxines flocculaient très bien, la flocculation initiale apparaissait avec un même sérum dans un temps variant de deux heures jusqu'à trois heures et

demie. Pour obtenir les anatoxines, on ajoutait aux toxines 5 cent. cubes de la solution commerciale de formol. On maintenait les toxines formolées pendant trente jours à l'étuve à la température soit de 38° à 40°, soit de 40° à 42°.

Nous avons utilisé 6 lots d'anatoxine.

Ces anatoxines étaient complètement inoffensives pour des cobayes d'un poids de 250 grammes à la dose de 5 cent. cubes injectés sous la peau. Leur valeur antigène oscillait entre 7 et 8 unités. *L'avidité de la floculation comparée à celle des toxines originelles n'était pas la même dans toutes les séries. Trois séries d'anatoxines (VI^e, X^e, XIII^e) conservaient entièrement l'avidité de floculation des toxines originelles; les autres séries (III^e, V^e, VIII^e) présentaient une avidité diminuée avec un retard de floculation de deux heures et demie, trois heures et cinq heures.*

Dans les expériences d'immunisation effectuées au préalable chez le cobaye, les anatoxines manifestaient un pouvoir vaccinant; par exemple, après la vaccination unique des cobayes de 250 grammes avec des doses 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, l'immunité appréciée par la réaction de Schick apparaissait dans un délai de dix-sept à vingt-quatre jours. Malgré les différences d'avidité entre les divers échantillons, les essais sur le cobaye ne révélaient pas de différences profondes quant au pouvoir immunisant; nous avons montré plus haut pourquoi il en est ainsi.

La méthode d'immunisation active chez l'homme.

« Les réactions chez les vaccinés ».

Pour obtenir l'immunité dans un temps relativement court, il est nécessaire d'employer une certaine dose d'anatoxine, c'est ce que montre l'expérimentation chez les animaux. Mais chez l'homme, la quantité d'anatoxine que l'on peut injecter est limitée par la susceptibilité de certains individus aux protéines que contient l'anatoxine. C'est ainsi que des doses de 0 c. c. 5, 1 cent. cube. et 1 cent. cube 1/2 nous ayant paru donner parfois de fortes réactions, nous les avons diminuées et nous avons essayé la vaccination en un seul ou en deux temps avec 0 c. c. 3 et 0 c. c. 5.

Ce n'est d'ailleurs pas encore l'idéal, puisqu'on observe

même avec ces doses des réactions locales ou générales chez un certain nombre d'individus.

Ainsi, sur 1.000 écoliers vaccinés d'après ce schéma, chez 15 p. 100 d'entre eux la réaction était nulle; chez 78 p. 100, on observait une réaction locale légère ou modérée (rougeur, infiltration, douleur); *enfin, chez 7 p. 100, il y eut une assez forte réaction locale ou générale.*

Pour la vaccination des enfants, nous nous sommes arrêtés aux doses citées de 0 c. c. 3 et 0 c. c. 5.

La difficulté pratique de la vaccination en trois fois nous a incités à essayer la méthode *en deux temps*. Les bons résultats que nous obtenions avec cette méthode chez les animaux autorisaient ces essais. En même temps, nous fîmes des essais de vaccination *en une fois*, ce qui est particulièrement désirable au point de vue pratique.

Nous nous sommes arrêtés au schéma de vaccination en deux temps, l'emploi de doses faibles par exemple 0 c. c. 3, 0 c. c. 5, ce qui correspond à 2 unités et 3 unités 1/2 de nos anatoxines.

Nous allons voir les bons résultats obtenus en mettant en œuvre cette méthode.

Ajoutons qu'en utilisant des doses faibles d'anatoxine nous avons pu mettre en évidence des différences entre les propriétés des divers échantillons d'anatoxine.

Les résultats de l'immunisation appréciés par la réaction de Schick.

Les résultats acquis par l'immunisation de nombreux enfants au moyen de l'anatoxine peuvent être résumés ainsi :

L'anatoxine diphtérique peut manifester un pouvoir immunisant très élevé, même si elle est employée en une ou deux vaccinations seulement aux doses de 2 unités et de 3 unités 1/2. Cependant, même à nombre d'unités équivalent, les lots d'anatoxine font parfois preuve d'une activité inégale. L'immunité obtenue est meilleure lorsque les anatoxines présentent une avidité (ou vitesse de floculation) se rapprochant de celle de la toxine originelle.

Voici quelques résultats acquis avec ces anatoxines :

1° Vaccination en une fois (2 unités antigéniques). Immunité de 88,3, 96,6 p. 100 (1) dans un délai de trois, quatre semaines à deux mois et demi (126 enfants).

2° Vaccination en deux fois. Immunité de 93,3, 96 p. 100 dans un délai de trois, quatre semaines à deux mois et demi, en comptant l'intervalle entre les deux vaccinations, contrôle, 622 enfants.

Les statistiques ci-dessous illustrent les résultats des vaccinations, elles montrent en particulier l'influence de la vitesse (avidité) de floculation de l'anatoxine sur sa valeur immunisante.

VACCINATION EN UN TEMPS.

Séries d'anatoxine VI, X et XIII, floculation sans retard, contrôle, 126 enfants. Immunité dans 88,3 p. 100, 96,6 p. 100 dans un délai de trois, quatre semaines à deux mois et demi.

Séries d'anatoxine III et V, floculation avec retard de deux heures et demie jusqu'à cinq heures, contrôle, 154 enfants. Immunité dans 73,3 p. 100, 80 p. 100 dans un délai de deux mois et demi jusqu'à quatre mois.

Anatoxine X, floculation sans retard, contrôle, 64 enfants. Immunité de 92,4 p. 100, 96,6 p. 100 dans un délai de trois, quatre semaines à deux mois et demi.

Anatoxine V, floculation avec un retard de deux heures et demie, contrôle, 64 enfants. Immunité de 92,4 p. 100, 93,8 p. 100 dans le délai de deux mois et demi à quatre mois.

Anatoxine III, floculation avec un retard de cinq heures, contrôle, 93 enfants. Immunité de 60,3 p. 100, 72 p. 100 dans un temps de deux mois et demi jusqu'à quatre mois.

VACCINATION EN DEUX TEMPS.

Séries d'anatoxine X à XIII, floculation sans retard, contrôle, 622 enfants. Immunité dans 92,3 p. 100, 96 p. 100 dans un délai de trois à quatre semaines jusqu'à deux mois et demi.

Séries d'anatoxine III et V, floculation avec retard de deux

(1) Remarque : dans les chiffres cités le premier nombre (exemple 88,3 p. 100) indique le pourcentage des réactions négatives de Schick, le deuxième nombre (93,6 p. 100) indique la somme de résultats négatifs + douteux (+).

heures et demie à cinq heures, contrôle, 553 enfants. Immunité de 83,4 p. 100, 92,4 p. 100 dans un temps de deux à quatre mois.

Séries d'anatoxine III, VIII, V; flocculation sans retard, VIII et avec retard, III et V, de deux heures et demie à cinq heures, contrôle, 353 enfants. Immunité de 92,7 p. 100, 95,2 p. 100 dans un délai de deux mois et demi à trois mois et demi.

En concluant, il n'est pas sans intérêt de citer que, dans une expérience, 45 enfants présentant une réaction positive de Schick furent immunisés en deux temps par une anatoxine très avide (VIII) avec des doses 1,4 AE et 2 AE. Après un mois, l'immunité fut découverte dans 70 p. 100, 82,3 p. 100. Ainsi en opérant même avec des doses assez faibles d'anatoxine, on obtient encore des résultats assez bons, si l'on remarque que le contrôle était effectué un mois seulement après la première vaccination.

Observations ultérieures sur les enfants.

Comme nous l'avons déjà indiqué, les enfants vaccinés par l'anatoxine restaient en observation par les soins de l'organisation municipale de la santé publique à Bakou. Au cours des deux années qui ont suivi l'immunisation (1926-1928), parmi les enfants vaccinés, on n'a enregistré aucun cas de diphtérie malgré que nombre d'enfants étaient porteurs de germes diphtériques. Pendant la même période, on observait à Bakou 550 cas de diphtérie parmi les enfants non vaccinés. Ainsi, même au point de vue épidémiologique, la vaccination préventive par l'anatoxine donna des résultats très satisfaisants.

Quelques observations sur l'importance de l'individualité.
Changements allergiques de la réaction de Schick.

Déjà les expériences chez les animaux de laboratoire montrent que le facteur individualité peut jouer un certain rôle dans la production de l'immunité. Par exemple, chez les cobayes de même âge (poids, 250 grammes), l'influence de l'individualité peut se manifester assez nettement dans les expériences

d'immunisation avec les très petites doses d'anatoxine. Mais ce facteur se manifeste encore plus distinctement chez les lapins, comme l'ont montré les expériences spéciales de notre collaboratrice H. Brenn (1926). En voici quelques exemples :

1° Un lapin d'un poids de 825 grammes est vacciné en deux fois avec une semaine d'intervalle avec les doses d'anatoxine de 0 c. c. 1, 0 c. c. 2. L'immunité se développe en douze jours (l'animal supporte une injection sous-cutanée de 2 DZM de toxine).

Un autre lapin d'un poids de 790 grammes vacciné en même temps, et par le même schéma, est immunisé (d'après l'épreuve de Schick) en cent jours seulement.

2° Lapin de 500 grammes. Vaccination unique par l'anatoxine à la dose de 0 c. c. 1, l'immunité apparaît en vingt-quatre jours.

Lapin du poids de 760 grammes vacciné en même temps dans les conditions identiques au précédent; immunité en soixante jours.

La vaccination de l'espèce humaine par l'anatoxine permet d'observer des faits analogues affirmant l'influence d'individualité sur la production de l'immunité.

Deux médecins chez qui la réaction de Schick se montrait positive furent vaccinés en deux fois avec des doses de 0 c. c. 5 à 1 cent. cube de la même anatoxine. Dans l'un des cas, la réaction positive disparut en quinze jours, dans l'autre cas elle restait positive au bout d'un an.

Voici encore trois autres cas d'immunisation en deux temps (chez des collaborateurs de l'Institut) avec des doses de 0 c. c. 2-0 c. c. 3. Chez l'un, la réaction de Schick disparut en vingt-deux jours, chez l'autre au bout de soixante jours, et chez le troisième au bout de quatre mois. Dans ces cas, la vaccination était faite avec une même anatoxine. Il n'y avait aucun rapport entre l'intensité de la réaction Schick et le temps d'apparition de l'immunité.

En comparant les résultats de vaccination chez les enfants et chez les adultes, on se rend compte que le *facteur individualisé est plus important parmi les adultes que chez les enfants.*

Il est intéressant de remarquer en même temps que dans les cas de retard dans la production de l'immunité la réaction de Schick avant de devenir négative peut subir les changements particuliers de nature allergique.

Parfois cette réaction allergique se développe *plus rapidement* que dans les conditions normales : elle commence déjà le jour suivant l'injection par une rougeur violente. Dans la suite, l'hyperhémie et l'infiltration augmentent progressivement, atteignant vers le troisième ou quatrième jour jusqu'à 5 ou 6 centimètres de diamètre. Plus tard, les symptômes s'affaiblissent peu à peu, s'accompagnant de desquamation et laissant une très forte pigmentation, qui se maintient pendant le cours de plusieurs mois et même d'années.

La réaction allergique se traduit par une sensation de douleur et par du prurit. Par la répétition de la réaction de Schick en série sur le même sujet, son état allergique s'affaiblit peu à peu et, à la fin de la réaction, peut devenir négative.

Il faut remarquer que ces changements allergiques de la réaction peuvent s'observer chez les sujets présentant primitivement une réaction de Schick très faible.

Cette réaction allergique n'a aucun rapport avec la pseudo-réaction qui, dans le cas examiné, était absente.

La pathogénie des changements allergiques de la réaction de Schick, dans la période précédant l'immunité, reste encore obscure.

Nos expériences spéciales sur les lapins ont démontré que l'état allergique de la réaction de Schick n'est pas général dans la période précédant l'immunité.

On peut donc penser que les changements allergiques de la réaction chez les hommes sont liés à la question de l'*individualité* de l'organisme.

III. — ANATOXINE DIPHTÉRIQUE CONCENTRÉE

Quoique, dans l'immunisation des enfants par l'anatoxine, nous ayons obtenu des résultats très suffisants, il nous a semblé que ces résultats sont encore loin d'épuiser toutes les possibilités de perfectionnement que l'anatoxine peut donner. En particulier, par analogie avec les expériences sur les animaux, il nous paraissait très probable qu'en employant une méthode correspondante d'hyperimmunisation on peut réduire le temps nécessaire pour la production de l'immunité.

D'un autre côté, les résultats encourageants de vaccination unique avec les petites doses d'anatoxine permettaient d'admettre *qu'on peut produire l'immunité dans un temps plus court, même par la vaccination en un temps.*

Comme nous l'avons déjà vu, l'emploi de l'anatoxine provoque chez certains individus âgés une réaction locale et générale qu'on peut chercher à éviter.

Il nous semblait probable que ces réactions dépendent du contenu protéique ou d'autres composés non spécifiques qui sont présents dans le milieu support de l'anatoxine.

Nous devons ajouter qu'avec l'anatoxine préparée à l'Institut Pasteur par les soins de Ramon les réactions sont réduites au minimum (d'après les très nombreux expérimentateurs qui ont utilisé cette anatoxine sur des centaines de milliers d'individus).

Nous avons entrepris un certain nombre d'essais en vue de purifier l'anatoxine que nous produisons des matériaux protéiques qui l'encombrent. Pour cela, nous utilisâmes le *principe* déjà connu de la concentration de toxine et d'anatoxine au moyen de leur précipitation par les acides (Watson et Wallace, Glenny, Bächer, Kraus, Löwenstein, Predteczenski et Scheriakova).

Les nombreuses expériences de l'un de nous (Haliapine) montrent que les protéines spécifiques de l'anatoxine diphtérique se précipitent facilement en abaissant le PH de l'anatoxine par acidification. Le précipité formé peut se redissoudre dans la solution physiologique (0,85 p. 100) de NaCl, alcalinisée jusqu'au PH de départ.

En se servant de la méthode citée, on peut concentrer la substance spécifique de l'anatoxine. Mais les observations ont montré que dans les procédés de concentration par l'acide les protéines spécifiques de l'anatoxine peuvent subir certaines altérations qui se font très nettement sentir sur le pouvoir flocculant du produit obtenu. *Le degré d'altération dépend de la nature de l'acide, du temps de son action, de la température extérieure et probablement du contact des protéines précipitées avec l'oxygène.*

Parmi les différents acides examinés, l'acide acétique et chlorhydrique produisent l'action la plus nocive. De meilleurs

résultats sont obtenus avec l'acide orthophosphorique (mais non métaphosphorique) [1].

Si la concentration de l'anatoxine est effectuée au moyen de l'acide orthophosphorique et, si le temps de la manipulation est réduit au minimum, on peut, comme règle, obtenir une anatoxine concentrée flocculant très bien avec le sérum spécifique. Si cette concentration est faite à une température peu élevée, les résultats sont encore meilleurs.

Cependant, même en employant cette méthode, il est difficile d'éviter complètement la diminution de l'avidité de la flocculation qui représente une altération partielle de l'anatoxine.

L'anatoxine concentrée ainsi floccule avec un retard plus ou moins grand par rapport à la flocculation de l'anatoxine originale non concentrée.

Comme nous le verrons plus tard l'anatoxine concentrée, malgré son avidité diminuée, garde un pouvoir vaccinant très suffisant.

Dans la pratique courante de notre Institut nous employons très largement l'anatoxine concentrée pour l'immunisation de l'homme et des animaux et toujours avec de bons résultats. Avant de parler de ces résultats, exposons en quelques mots la méthode pratique qui nous sert pour la concentration des anatoxines (la méthode de Haliapine).

Pour la concentration de l'anatoxine, nous employons la solution normale de l'acide orthophosphorique (2). Dans les expériences préalables, on détermine la quantité de l'acide amenant la précipitation optima de l'anatoxine. Pour cela, dans une série de tubes à essai qui contiennent 5 cent. cubes d'anatoxine, on ajoute des quantités décroissantes de la solution d'acide orthophosphorique (par exemple 0,5, 0,48, 0,46, 0,44, 0,42, etc...).

Après, on ajoute à tout le volume d'anatoxine qu'on veut concentrer la quantité d'acide déterminé par l'essai précédent. Dès que la précipitation commence à s'opérer dans l'anatoxine acidulée, on la filtre sur papier. Après filtration, on dissout

(1) Dans une communication récente (*C. R. Soc. de Biol.*, 98, 1928, p. 351.), G. Ramon a montré que certains agents chimiques, et en particulier l'acide chlorhydrique, altèrent la valeur antigène de l'anatoxine. Nos propres essais confirment cette constatation.

(2) D'après nos expériences, l'acide métaphosphorique dénature l'anatoxine plus fortement que l'acide orthophosphorique.

rapidement le dépôt sur le même filtre, avec la quantité nécessaire de la solution physiologique de NaCl, alcalinisée préalablement par $\text{PO}_4\text{Na}^2\text{H}$ jusqu'au pH de l'anatoxine de départ. Naturellement, toute manipulation doit se passer dans les conditions d'asepsie rigoureuse.

Pour éviter la possibilité d'altération de l'anatoxine concentrée, il est indispensable d'exécuter les manipulations de concentration avec la plus grande rapidité; la température basse est préférable.

Pour apprécier la valeur de l'anatoxine concentrée ainsi obtenue on la dissout jusqu'au volume de l'anatoxine origine et on l'éprouve par la floculation vis-à-vis du sérum spécifique. On détermine ainsi le contenu en unités antigéniques; un essai parallèle avec l'anatoxine originelle sert de contrôle.

En comparant le temps d'apparition de la floculation avec celle de l'anatoxine originelle on peut ainsi apprécier le degré d'altération du produit concentré.

Dans la pratique, nous nous bornons habituellement à une concentration de 10 fois celle de l'anatoxine de départ.

L'anatoxine concentrée a été employée dans notre Institut pour l'hyperimmunisation de l'homme et de différents animaux (chevaux, ânes, cobayes).

L'emploi de cette préparation nous permet de résoudre d'une façon très suffisante le problème de la production d'immunité chez l'homme dans le délai le plus court et dans les conditions les plus pratiques. En même temps cette méthode nous donne la possibilité de préparer chez les chevaux des sérums de haute valeur antitoxique.

Citons quelques observations qui s'y rapportent.

Immunisation des chevaux.

Les essais d'immunisation des chevaux par l'anatoxine concentrée nous ont donné de bons résultats. Comme exemple nous allons exposer le cas d'un cheval d'expérience que nous avons observé pendant deux ans.

Le cheval « Aigle » de janvier à novembre 1926 se trouvait en immunisation ordinaire par l'anatoxine avec tapioca

(d'après Ramon). Le titre du sérum pendant cette année oscillait de 310 AE jusqu'à 520 AE, donnant en moyenne 440 AE.

A partir du mois de décembre 1926, c'est-à-dire onze mois après le commencement de l'immunisation et des saignées systématiques, le cheval fut soumis à l'hyperimmunisation par l'anatoxine concentrée (mélangée au tapioca) qui fut continuée jusqu'à mars 1928, c'est-à-dire pendant quinze mois. Au cours de cette période le titre du sérum oscillait de 550 AE jusqu'à 1.200 AE, donnant en moyenne 900 AE.

La dernière saignée était faite en mars 1928; après deux injections d'anatoxine concentrée, le titre du sérum était de 1.200 unités.

Malgré l'immunisation et les saignées pendant vingt-sept mois (nous reçûmes au total 100 litres de sang), le cheval ne fut pas épuisé, resta très bien portant; il continue à donner un sérum très bon.

L'exemple cité démontre, clairement, quel résultat peut donner l'hyperimmunisation par l'anatoxine concentrée, qui permet d'introduire sous un petit volume une énorme quantité d'un antigène inoffensif.

Immunisation des enfants.

Des observations préalables nous ont montré que les enfants de sept à quatorze ans supportent très bien l'anatoxine concentrée en quantité considérable. Par exemple : on peut injecter aux enfants 50-60 AE d'anatoxine sans aucun risque de provoquer quelque réaction désagréable. Actuellement, nous pratiquons l'immunisation des enfants par l'anatoxine concentrée. La vaccination par l'anatoxine concentrée donne des résultats excellents et permet d'immuniser dans un temps très court même après une seule injection de notre anatoxine. Voilà quelques résultats préalables de cette immunisation des enfants par l'anatoxine concentrée.

200 enfants présentant une réaction de Schick positive subissent la vaccination en un temps avec une anatoxine

concentrée ayant une bonne avidité (1) aux doses 25-30 AE. La vaccination ne s'accompagne pas en général de réaction. Chez 64 enfants, après deux à trois semaines, une réaction de Schick fut faite comme contrôle. Elle se montra positive dans 3,2 p. 100; dans 85,9 p. 100 elle était négative et dans 10,9 p. 100 était douteuse.

Ajoutons que le contrôle d'après la réaction de Schick d'un autre groupe de 27 enfants vaccinés, effectué de quatre à six semaines après l'immunisation, donna des résultats presque identiques à ceux du premier groupe.

Dans un troisième groupe d'enfants la vaccination était effectuée avec une anatoxine concentrée assez altérée quant à son pouvoir floculant (le retard de la floculation initiale par comparaison avec celui de l'anatoxine de départ était de douze à seize heures environ). Dans ce groupe, les résultats n'étaient pas comparables; par exemple, chez 19 enfants la réaction de Schick était positive chez 12 (63,1 p. 100) et négative seulement chez 7 (36,9 p. 100) dans un délai de deux jusqu'à quatre semaines après l'immunisation.

Ainsi, ici encore, se trouve affirmée la valeur de la floculation et en particulier de l'avidité de floculation comme indicatrices du pouvoir immunisant.

L'anatoxine concentrée permet de résoudre d'une façon satisfaisante le problème (que nous avons posé) de la production d'une immunité suffisante avec un minimum de réaction.

Nous avons également réussi à produire l'immunité au moyen de la vaccination en un temps, c'est-à-dire dans les conditions les plus pratiques et aussi dans un temps le plus court. Cependant, pour l'appréciation exacte de la valeur de la méthode, il convient encore d'étudier la durée de l'immunité produite dans ces conditions. Comme nous l'avons déjà dit, nous ne disposons pas encore d'une méthode de concentration de l'anatoxine qui conserve intégralement son avidité. Autrement dit, il faut considérer notre anatoxine concentrée, même dans les meilleurs cas, comme partiellement dénaturée, mais ce défaut de qualité du vaccin est compensé par les quantités énormes d'unités antigéniques que reçoit l'organisme.

(1) L'apparition de la floculation initiale doublement retardée en comparaison de l'anatoxine de départ.

Nous pensons que la préparation d'une anatoxine concentrée qui aurait conservé toute son avidité (d'après la floculation) serait désirable et nous espérons que l'on pourra y arriver dans l'avenir.

Conclusions.

L'anatoxine diphtérique donne toutes facilités pour étudier la question générale des anatoxines posée par les recherches de G. Ramon.

La valeur de l'anatoxine diphtérique peut être appréciée à la fois quantitativement (en unités antigéniques) et qualitativement (avidité pour l'antitoxine) au moyen de la réaction de floculation.

Grâce à l'anatoxine diphtérique, il est facile d'immuniser l'homme vis-à-vis de la toxi-infection diphtérique.

On peut préparer une anatoxine diphtérique concentrée (au moyen de l'acide orthophosphorique) qui, quoique diminuée dans son avidité, peut, en utilisant de très grosses doses, servir à l'immunisation de l'homme et des animaux producteurs de sérum antidiphtérique.

RECHERCHES SUR L'ANAPHYLAXIE SÉRIQUE

par E. SUAREZ et W. SCHÆFER.

DEUXIÈME MÉMOIRE)

L'antianaphylaxie : ses caractères.

Les animaux sensibilisés avec le sérum d'une espèce déterminée ne sont susceptibles d'acquérir l'antianaphylaxie qu'après l'injection de sérum de la même espèce. On sait que l'antianaphylaxie est spécifique, elle s'établit très rapidement et persiste longtemps.

Le choc précède souvent l'antianaphylaxie, si bien que l'on a l'habitude de considérer les deux phénomènes comme liés entre eux.

L'antianaphylaxie étant proportionnelle à la dose d'antigène injectée, l'injection par voie sanguine d'un sérum peu toxique (sérum chauffé) produit une antianaphylaxie solide. En ce cas, l'antianaphylaxie apparaît sans être précédée d'un choc; il faut noter cependant que le sérum chauffé étant seulement trois fois moins toxique que le sérum frais, on ne saurait parfois éliminer le choc d'une façon absolue.

Les animaux éprouvés par la voie intrapéritonéale ou sous-cutanée, avec des doses fortes d'antigène, acquièrent également l'antianaphylaxie au bout d'un certain délai, sans présenter de choc apparent (choc retardé) (1).

PROPRIÉTÉS ANTIANAPHYLACTIQUES

DES DIVERSES FRACTIONS PROTÉIQUES DE SÉRUM.

Ayant eu à notre disposition les divers antigènes qui entrent dans la composition du sérum, nous nous sommes proposé

(1) Il existe un seul cas d'antianaphylaxie qui n'est pas précédée du tout de choc; c'est celui des animaux sensibilisés au lait qui, après l'administration par voie buccale de petit-lait, présentent de l'antianaphylaxie sans avoir eu le moindre choc (Besredka).

d'en étudier les propriétés antianaphylactiques. L'intensité de l'antianaphylaxie étant en rapport avec la toxicité de l'antigène, nous avons étudié en même temps ces deux propriétés.

Pour l'étude de la toxicité de chaque protéine, nous avons pris, comme terme de comparaison, la toxicité du sérum complet dont elle provenait.

Les cobayes qui nous ont servi dans nos expériences pesaient entre 270 grammes et 340 grammes. Ils ont été sensibilisés avec $1/100$ de centimètre cube de sérum frais, puis éprouvés au bout de vingt-trente jours.

La toxicité absolue (en milligrammes) des protéines du même sérum s'était montrée très variable : elle dépendait du degré de sensibilisation des animaux et de la nature des sérums thérapeutiques.

Pour cette raison, nous avons employé constamment des protéines, fraîchement préparées et provenant du sérum employé à la sensibilisation.

Pour l'étude de l'antianaphylaxie, nous avons pris comme unité la dose *précritique* (1) de sérum frais.

Les protéines sériques étaient injectées par voie intra-artérielle, à des doses précritiques. La comparaison des quantités de protéine injectée dans chaque cas nous donnait la valeur antianaphylactique de la protéine.

Quelques-uns des animaux étaient éprouvés immédiatement après l'injection antianaphylactique; d'autres, deux à trois jours plus tard. De cette façon nous vérifiâmes, d'une part, l'apparition immédiate de l'antianaphylaxie et, d'autre part, sa persistance.

TOXICITÉ ET PROPRIÉTÉS ANTIANAPHYLACTIQUES DE L'EUGLOBULINE.

L'euglobuline pure montrait une toxicité légèrement supérieure à celle du sérum complet.

Cependant la toxicité du sérum devenait deux à trois fois plus faible quand on retirait du sérum la totalité de son euglobuline (20 p. 100 du contenu, en protéines du sérum complet).

L'euglobuline impure (avec approximativement 10 p. 100 de

(1) Dénomination de Besredka pour la dose d'antigène précédant la mortelle.

pseudoglobuline) était de deux à trois fois plus toxique (1) que le sérum complet. Ceci montre que la toxicité de l'euglobuline diminue au cours de sa purification.

L'euglobuline pure, injectée par voie intra-artérielle, ne protège pas contre la réinjection de sérum complet : les animaux qui ont eu un choc après l'injection d'euglobuline ne résistent pas à la réinjection de sérum.

COBAYE : 40-7/8.

Éprouvé : 10 juin avec 1/2 cent. cube d'euglobuline : choc net.

Réinjecté : 13 juin avec 3/4 cent. cube d'euglobuline : choc léger, malaise.

Réinjecté : 13 juin avec 1 cent. cube d'euglobuline : pas de choc, malaise.

Réinjecté : 15 juin avec une dose mortelle de sérum complet : *choc mortel*.

Dans quelques cas, les cobayes sensibilisés au sérum étaient protégés par l'euglobuline contre la réinjection d'euglobuline; mais cette antianaphylaxie était faible et éphémère (un à deux jours de durée). Dans d'autres cas, l'euglobuline manquait complètement de propriétés protectrices (2).

COBAYE : 40-45/46.

Éprouvé : 12 juin avec 1 cent. cube d'euglobuline : choc net.

Réinjecté : 14 juin avec 2 cent. cubes d'euglobuline : presque pas de symptômes.

Réinjecté : 15 juin avec 1 dose mortelle de sérum complet : *choc mortel*.

L'euglobuline pure, injectée à hautes doses par les voies sous-cutanée ou intrapéritonéale, ne donnait pas d'antianaphylaxie.

COBAYE : 41-75/76.

Injecté : 8 juillet avec 3 cent. cubes d'euglobuline par la voie intrapéritonéale et 2 cent. cubes d'euglobuline par la voie sous-cutanée.

Éprouvé : 12 juillet avec 2 doses mortelles de sérum complet : *choc mortel*.

L'euglobuline étant pratiquement dénuée de pouvoir anti-anaphylactique, il nous a paru que le sérum privé d'euglobuline,

(1) La toxicité de l'euglobuline impure était de 2 milligrammes, celle du sérum dont elle provenait était de 5 milligr. 2. La toxicité de l'euglobuline pure était de 0 milligr. 28, celle du sérum dont elle provenait était de 0 milligr. 32.

(2) Ces cas se produisaient constamment quand l'euglobuline était absolument pure (elle ne sensibilisait pas contre la pseudoglobuline).

moins toxique que le sérum complet, devait mieux antianaphylactiser que ce dernier; l'expérience a confirmé notre hypothèse.

COBAYE : C. 48.

Éprouvé : 24 avril avec 1/200 cent. cube de sérum sans euglobuline : choc léger.

Éprouvé : 5 minutes après avec 1/100 cent. cube de sérum sans euglobuline : pas de choc.

Éprouvé : cinq minutes après avec 1/50 cent. cube de sérum complet (4 doses mortelles) : *pas de choc, léger malaise.*

TOXICITÉ ET PROPRIÉTÉS ANTIANAPHYLACTIQUES DE LA PSEUDOGLOBULINE.

La pseudoglobuline possède une toxicité semblable à celle du sérum complet.

Les animaux sensibilisés au sérum complet présentent, à l'injection d'une dose précritique de pseudoglobuline, une anti-anaphylaxie contre le sérum complet, égale à celle produite par la dose précritique dudit sérum.

COBAYE : 40-98.

Éprouvé : 1^{er} juillet avec 1/4 cent. cube de pseudoglobuline : choc net.

Réinjecté : 3 juillet avec 2 doses mortelles de sérum complet : *léger choc.*

TOXICITÉ ET PROPRIÉTÉS ANTIANAPHYLACTIQUES DE LA SÉRUMALBUMINE.

La toxicité de la sérumalbumine a été discutée pendant longtemps.

Pour Gay et Adler, elle est la partie la plus toxique du sérum. Pour Doerr et Berger, elle est la partie la moins toxique; selon Ruppel et ses collaborateurs, elle est complètement dépourvue de toxicité.

Dans nos expériences, la sérumalbumine était, en général, deux à trois fois moins toxique que le sérum complet dont elle provient.

Dans certains cas exceptionnels, la sérumalbumine était aussi toxique que le sérum complet (sérumalbumine de sérum antidiphthérique pour les animaux sensibilisés au même sérum).

Dans d'autres cas, la toxicité était 10 fois inférieure à celle du sérum complet (animaux sensibilisés avec un sérum thérapeutique de haut titre et éprouvés avec de la sérumalbumine provenant d'un sérum normal).

Quelquefois la sérumalbumine paraissait presque atoxique (animaux sensibilisés au sérum antidysentérique et éprouvés avec l'albumine provenant du sérum antidiphtérique) : c'est-à-dire que la toxicité de la sérumalbumine est variable selon la nature des sérums employés tant à la sensibilisation qu'à l'épreuve (1).

L'antianaphylaxie, que confère la dose précritique de sérumalbumine, est semblable à celle produite par une dose correspondante de sérum complet. La quantité de protéines contenues dans cette dose étant supérieure à celles du sérum complet, il en résulte que les propriétés antianaphylactiques de la sérumalbumine sont inférieures à celles du sérum.

COBAYE : C. 79.

Éprouvé : 7 février avec 1/40 cent. cube de sérum complet (2 milligrammes de protéine) : choc net.

Réinjecté : 8 février avec 2 à 3 doses mortelles de sérum complet : *choc; malaise.*

COBAYE : C. 84.

Éprouvé : 7 février avec 1/10 cent. cube de solution de sérumalbumine (5 milligrammes de protéine) : choc net.

Réinjecté : 8 février avec 2 à 3 doses mortelles de sérum complet : *léger choc.*

Les cas dans lesquels la sérumalbumine était atoxique furent particulièrement intéressants. L'injection des petites doses de cette substance par la voie intra-artérielle produisait de l'antianaphylaxie; il en a été de même par les voies sous-cutanée et intrapéritonéale.

COBAYE : 41-73/74.

Éprouvé : 8 juillet avec 1/2 cent. cube de sérumalbumine : pas de symptômes.

Réinjecté : 11 juillet avec 2 doses mortelles de sérum complet : *pas de symptômes.*

(1) Voir C. R. Soc. de Biol., 98, 1928, p. 11.

COBAYE : 11-11/12.

Injecté : 4 juillet avec 3 cent. cubes de sérumalbumine par la voie sous-cutanée

Réinjecté : 7 juillet avec 4 doses mortelles de sérum complet (voie intra-artérielle) : *choc léger et malaise.*

COBAYE : 11-81/82.

Injecté : 4 juillet avec 2 cent. cubes de sérumalbumine par la voie intrapéritonéale.

Réinjecté : 6 juillet avec 4 doses mortelles de sérum complet (voie intra-artérielle) : *pas de choc, malaise et légère faiblesse des membres postérieurs.*

Dans ces cas nous avons été sûrs de ne pas produire de choc, parce que même les hautes doses de sérumalbumine (3 cent. cubes = 60 milligrammes de protéine), injectées par voie intra-artérielle, ne produisaient pas le moindre trouble. Ces fortes doses conféraient une antianaphylaxie beaucoup plus solide que celle consécutive à une injection de sérum complet qui avait provoqué un choc grave.

COBAYE : 8-65/66.

Éprouvé : 11 juillet avec 3 cent. cubes de sérumalbumine : pas de symptômes.

Réinjecté : 15 juillet avec 8 doses mortelles de sérum complet : *choc léger et de très courte durée.*

La comparaison des propriétés antianaphylactiques et toxiques des antigènes sériques montre que ces propriétés n'y sont pas réparties d'une façon égale.

L'injection d'une fraction protéique de sérum (à l'exception de l'euglobuline) confère aux animaux, sensibilisés au sérum complet, l'antianaphylaxie contre elle-même et contre les autres fractions, c'est-à-dire contre le sérum complet.

L'ANTIANAPHYLAXIE SUIT-ELLE LA SPÉCIFICITÉ DES ANTIGÈNES SÉRIQUES?

Nous avons recherché si les animaux, sensibilisés avec un des antigènes sériques, puis injectés avec un autre antigène, peuvent acquérir, sans présenter de choc, l'antianaphylaxie pour l'antigène ayant servi à la sensibilisation.

A. *Animaux sensibilisés à l'euglobuline.* — Les animaux, sensibilisés avec de l'euglobuline, puis éprouvés avec cette dernière à des doses précritiques, présentent un choc; mais, celui-ci n'est pas suivi d'antianaphylaxie, si l'euglobuline employée à l'épreuve est pure (1).

La réinjection à l'animal en question de la même dose précritique d'euglobuline produit le choc, celle d'une dose plus forte détermine la mort.

COBAYE : 11-54.

Éprouvé : 29 juin avec 1/80 cent. cube d'euglobuline : choc net.

Réinjecté une demi-heure après avec 1/20 cent. cube d'euglobuline (une dose mortelle) : malaise grave, dyspnée progressive : l'animal reste couché; commence à se remettre et redevient malade.

Réinjecté : 30 juin avec 1/10 cent. cube d'euglobuline (2 doses mortelles) : *choc mortel.*

COBAYE : 11-53.

Éprouvé : 27 juin avec 1/40 cent. cube d'euglobuline : choc grave.

Réinjecté : 29 juin avec 1/20 cent. cube d'euglobuline (une dose mortelle) : choc grave.

Réinjecté : 30 juin avec 1/20 cent. cube d'euglobuline (une dose mortelle) : *choc grave, mort quatre heures après.*

L'injection de pseudoglobuline ne produit aucun trouble. Cette injection, même à très petites doses, confère une anti-anaphylaxie marquée contre l'euglobuline; cette protection est d'autant plus remarquable que l'euglobuline ne protège pas contre elle-même.

COBAYE : A. 98.

Éprouvé 13 juillet avec 3 cent. cubes de pseudoglobuline (6 doses mortelles) (2) : pas de symptômes.

Réinjecté : 15 juillet avec 5 doses mortelles d'euglobuline : *pas de choc, léger malaise.*

COBAYE : A. 79.

Éprouvé : 13 juillet avec 1 cent. cube de pseudoglobuline (2 doses mortelles) : pas de symptômes.

Réinjecté : 15 juillet avec 2 doses mortelles d'euglobuline : *pas de symptômes.*

(1) Dans quelques cas, nous avons pu observer une diminution passagère de l'hypersensibilité qui disparaissait en deux jours.

(2) Les doses mortelles indiquées se rapportent aux animaux sensibilisés vis-à-vis du même antigène.

La sérumalbumine ne produit pas de choc et donne lieu à une faible antianaphylaxie, même injectée à hautes doses.

COBAYE : 41-37.

Éprouvé : 1^{er} juillet avec 3 cent. cubes de sérumalbumine (15 doses mortelles) : pas de symptômes.

Réinjecté : 4 juillet avec 2 à 3 doses mortelles d'euglobuline : *choc, malaise grave, survit.*

B. Animaux sensibilisés à la pseudoglobuline. — Les animaux, sensibilisés à la pseudoglobuline et éprouvés vis-à-vis de cette dernière, présentent un choc et sont ensuite antianaphylactisés. L'injection de pseudoglobuline provoque un choc et protège contre la réinjection de 2 doses mortelles, mais ne protège pas contre celle de 4 doses de pseudoglobuline.

COBAYE : D. 4.

Éprouvé : 25 avril avec 1/4 cent. cube de pseudoglobuline : choc net.

Réinjecté : 26 avril avec 1 cent. cube de pseudoglobuline (2 doses mortelles) : *léger choc.*

COBAYE : D. 8.

Éprouvé : 25 avril avec 1/4 cent. cube de pseudoglobuline : choc net.

Réinjecté : 26 avril avec 2 cent. cubes de pseudoglobuline (4 doses mortelles) : *choc mortel.*

La réinjection de sérumalbumine, sans produire le moindre trouble, donne lieu à une antianaphylaxie plus marquée que celle que confère une dose de pseudoglobuline, laquelle provoque un choc net.

COBAYE : D. 97.

Éprouvé : 3 août avec 3 doses mortelles de sérumalbumine (1 cent. cube) : pas de symptômes.

Réinjecté : 7 août avec 4 doses mortelles de pseudoglobuline (1 1/2 cent. cube) : *pas de choc.*

Ces animaux, éprouvés avec de l'euglobuline, peuvent présenter un certain degré d'antianaphylaxie. Cette antianaphylaxie ne parvient pas à protéger l'animal contre 2 doses mortelles de pseudoglobuline ; en outre, elle est inconstante (1)

(1) Nous avons vu qu'il était très difficile de vérifier la pureté absolue de

COBAYE : A. 19.

Éprouvé : 4 février avec 6 doses mortelles d'euglobuline (2 cent. cubes) : pas de symptômes.

Réinjecté : 5 février avec 2 doses mortelles de pseudoglobuline : *choc très grave*.

COBAYE : A. 18.

Éprouvé : 4 février avec 6 doses mortelles d'euglobuline (2 cent. cubes) : pas de symptômes.

Réinjecté : 5 février avec 1 dose mortelle de pseudoglobuline : *choc léger*.

C. *Animaux sensibilisés à la sérumalbumine*. — Les animaux, sensibilisés à la sérumalbumine, se laissaient facilement protéger par la réinjection de cette même substance, faite à la dose précritique. Cette protection porte d'emblée contre 3 doses mortelles, laquelle protection est rarement obtenue avec le sérum complet, chez les animaux sensibilisés avec ce dernier.

COBAYE : 8-82/83.

Éprouvé : 14 mai avec 1/4 cent. cube de sérumalbumine : *choc net*.

Réinjecté : 16 mai avec 3 doses mortelles de sérumalbumine (1 1/2 cent. cube) : *léger choc*.

L'injection de pseudoglobuline ne produit pas de trouble et confère une antianaphylaxie très marquée (contre 4 doses mortelles de sérumalbumine).

COBAYE : 8-55/56.

Éprouvé : 1^{er} juillet avec 4 doses mortelles de pseudoglobuline : pas de symptômes.

Réinjecté : 2 juillet avec 4 doses mortelles de sérumalbumine : *pas de choc*.

L'injection de fortes doses d'euglobuline pure ne protège pas contre la réinjection de sérumalbumine.

COBAYE : 8-84/85.

Éprouvé : 2 juillet avec 40 doses mortelles d'euglobuline (2 cent. cubes) : pas de symptômes.

Réinjecté : 6 juillet avec 2 doses mortelles de sérumalbumine : *choc net*.

L'euglobuline (épreuve de sensibilisation), et d'affirmer avec certitude l'absence de traces de pseudoglobuline; nous sommes par suite dans l'impossibilité d'affirmer que l'euglobuline soit, dans ce cas, complètement dépourvue de propriétés antianaphylactiques.

Il ressort de ces expériences que l'antianaphylaxie n'est pas strictement spécifique quant aux différents antigènes contenus dans le sérum; elle est nette pour les fractions voisines et presque nulle pour les fractions éloignées (fractions très différenciées) (1).

L'injection d'une fraction, à l'animal sensibilisé vis-à-vis d'une fraction voisine (pseudoglobuline pour euglobuline et pour sérumalbumine; sérumalbumine pour pseudoglobuline), ne produit pas de choc, mais protège, et cela plus fortement que si l'on avait injecté la fraction homologue, laquelle provoque le choc.

L'injection d'une fraction éloignée (sérumalbumine chez les animaux sensibilisés à l'euglobuline) confère une protection très faible ou nulle.

Conclusions.

On peut obtenir régulièrement l'antianaphylaxie sans choc; dans ce cas, l'antianaphylaxie est plus intense que celle consécutive au choc.

On peut obtenir le choc à répétition (euglobuline pure), sans avoir d'antianaphylaxie.

Entre le choc et l'antianaphylaxie, il n'existe pas de relation de cause à effet; il s'agit de phénomènes concomitants, susceptibles d'être dissociés.

Les recherches portant sur l'anaphylaxie et l'antianaphylaxie des diverses protéines du sérum autorisent à admettre que chacune d'elles est constituée par deux groupes de fonctions: sensibilisante et toxique, d'une part; et antianaphylactique, d'autre part.

Ces fonctions ne sont pas représentées d'une façon égale dans chacune des protéines sériques.

L'euglobuline est surtout sensibilisante et toxique; quant à ses propriétés antianaphylactiques, elles sont insignifiantes ou nulles.

Dans la pseudoglobuline, les deux fonctions sont représentées, comme dans le sérum complet.

(1) Voir Ces *Annales*, 8, 1928, p. 877.

La sérumalbumine possède plus de propriétés antianaphylactiques que de propriétés toxiques et sensibilisantes.

Les propriétés sensibilisantes et toxiques sont strictement spécifiques pour chaque antigène ; les propriétés antianaphylactiques sont communes à plusieurs fractions de sérum.

Une fraction hétérologue produit une meilleure antianaphylaxie qu'une fraction homologue, la première pouvant être injectée à une plus forte dose que la dernière.

(Travail du Laboratoire de M. Besredka à l'Institut Pasteur.)

RECHERCHES SUR L'ANAPHYLAXIE SÉRIQUE

par MM. E. SUAREZ et W. SCHÆFER (1).

(TROISIÈME MÉMOIRE.)

La spécificité anaphylactique des sérums thérapeutiques.

Au cours de recherches sur la toxicité et sur le pouvoir anti-anaphylactique des fractions du sérum, exposées dans un mémoire précédent (2), nous avons été frappés des irrégularités de la toxicité des sérumalbumines. Bien que préparées d'une façon identique, certaines sérumalbumines se sont montrées toxiques, chez les animaux sensibilisés, vis-à-vis du sérum complet; d'autres, au contraire, atoxiques.

En cherchant la cause de ces irrégularités, nous avons constaté que les sérumalbumines provenant d'un sérum antidiphthérique étaient atoxiques (1 à 2 cent. cubes) pour les cobayes sensibilisés avec du sérum antidysentérique. Ces mêmes sérumalbumines se montraient très toxiques (1/10 à 1/15 de cent. cube) pour les animaux sensibilisés avec du sérum antidiphthérique.

La toxicité des sérumalbumines variait donc avec la nature du sérum employé pour la sensibilisation. Cette toxicité était surtout accusée chez les animaux qui avaient été sensibilisés avec du sérum thérapeutique de même nom que la sérumalbumine employée pour l'injection.

Cela établi, nous avons recherché si d'autres sérums thérapeutiques auraient la même propriété.

Nos cobayes d'expériences pesaient entre 260 et 340 grammes. Ils ont été préparés avec des sérums thérapeutiques non

(1) Ces *Annales*, 8, 1928, p. 877.

(2) L'International Education Board (fondation Rockefeller) a donné à M. Schæfer une bourse qui lui a permis de travailler à l'Institut Pasteur. Il désire témoigner à cette Fondation ses sentiments de reconnaissance.

chauffés (1/100 de cent. cube sous la peau) provenant d'un ou de plusieurs chevaux. L'injection d'épreuve était faite toujours après le même délai d'incubation (vingt à trente jours), soit avec le sérum spécifique correspondant (provenant d'un ou de plusieurs chevaux), soit avec des sérums thérapeutiques autres que celui qui avait servi à la sensibilisation. Chaque série d'expériences portait sur 20 animaux ; souvent les expériences ont été répétées trois à quatre fois. Ces expériences ont porté sur plus de 300 animaux. La dose minima mortelle était déterminée chaque fois sur trois animaux.

Les résultats des expériences sont résumés dans le tableau ci-joint :

| NATURE DU SÉRUM employé pour la sensibilisation | DOSE MINIMA MORTELLE DE SÉRUM EN CENT. CUBES, EN INJECTION DÉCHAINANTE | | | | | | |
|---|---|---------------------------|------------------------|---------------------|------------------------------|----------------------|-----------------|
| | Sérum antidiphthérique | Sérum antidysentérique | Sérum antitétanique | Sérum antirouget | Sérum antistreptococcique | Sérum hémolytique | Sérum normal |
| Sérum antidiphthérique . . . | 1/80 | 1/23-1/50 | 1/40 | 1/20 | 1/40 | 1/20 | 1/20 |
| Sérum antidysentérique . . . | 1/4 | 1/40-1/60 | 1/12 | 1/10 | 1/30 | | 1/20 |
| Sérum antitétanique | 1/35 | 1/24 | 1/60 | 1/24 | 1/30 | | 1/20 |
| Sérum antirouget | 1/10 | 1/5 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/5 | 1/10 |
| Sérum antistreptococcique . | 1/20 | 1/60 | 1/40 | 1/60 | 1/80 | 1/10 | 1/20 |
| Sérum hémolytique | 1/20 | 1/20 | 1/10 | 1/8 | 1/10 | 1/20-1/30 | |
| Sérum normal | 1/80 | 1/80 | 1/80 | 1/80 | 1/80 | 1/80 | 1/80 |

Il résulte de ces expériences que la toxicité maxima est observée lorsqu'on se sert du même sérum spécifique, à la fois pour sensibiliser et pour provoquer le choc. La toxicité du sérum thérapeutique homologue est de une fois et demie à quatre fois plus grande que celle des autres sérums thérapeutiques, non spécifiques, ou celle de sérum normal.

La toxicité du sérum antidysentérique est dix fois plus grande que celle du sérum antidiphthérique lorsqu'il est injecté aux cobayes sensibilisés avec le sérum antidysentérique. Il est exceptionnel qu'un sérum étranger (sérum antidiphthérique et sérum antidysentérique) ait à peu près la même toxicité que

le sérum sensibilisant; le fait a été observé lors de la sensibilisation avec du sérum hémolytique.

Les animaux sensibilisés avec un sérum thérapeutique supportent le sérum normal à une dose deux à cinq fois plus forte que le sérum qui a servi à la sensibilisation.

Par contre, la toxicité des sérums thérapeutiques et des sérums normaux est la même chez les animaux qui avaient été sensibilisés avec du sérum normal.

Ces expériences montrent qu'il y a dans l'anaphylaxie sérique, à côté de la spécificité d'espèce, une autre spécificité qui correspond à la nature thérapeutique des sérums.

RAPPORT ENTRE LA SPÉCIFICITÉ ANAPHYLACTIQUE ET LA VALEUR ANTITOXIQUE DES SÉRUMS.

Nous avons constaté qu'un sérum antitétanique d'une valeur antitoxique faible (60 unités) ne conférait pas la spécificité dont il a été question plus haut, mais qu'il sensibilisait comme un sérum normal : tous les sérums produisaient le choc des animaux à la même dose.

Animaux sensibilisés avec 1 / 100 de cent. cube de sérum antitétanique (60 unités) :

Eprouvés :

Dose minima mortelle de sérum antitétanique, en cent. cubes. 1/40
Dose minima mortelle de sérum normal, en cent. cubes . . . 1/40

Les animaux sensibilisés avec un sérum antitétanique d'une valeur antitoxique élevée (450 unités) donnaient, au contraire, avec le sérum antitétanique, une réaction quatre fois plus forte qu'avec du sérum normal.

Animaux sensibilisés avec 1/100 de cent. cube de sérum antitétanique (450 unités) :

Eprouvés :

Dose minima mortelle de sérum antitétanique, en cent. cubes. 1/80
Dose minima mortelle de sérum normal, en cent. cubes . . . 1/16

Cette expérience montre que la spécificité anaphylactique du

sérum est sous la dépendance de la quantité d'anticorps qu'il contient.

Une autre constatation a été faite avec le sérum antidysentérique.

Ce dernier, d'une haute valeur antitoxique (protégeant la souris à 1/600 de cent. cube contre dix doses mortelles de toxine), sensibilisait spécifiquement.

Animaux sensibilisés avec 1/100 de cent. cube de sérum antidysentérique (cheval 28) :

Eprouvés le 30 octobre 1927 :

| | |
|---|------|
| Dose minima mortelle de sérum antidysentérique, en centimètres cubes. | 1/20 |
| Dose minima mortelle de sérum normal, en cent. cubes. | 1/20 |

Le même cheval fut saigné cinq mois plus tard ; son sérum servit à la sensibilisation d'une autre série d'animaux. Cette fois-ci, nous n'avons pas constaté de spécificité anaphylactique. Le dosage de ce sérum nous montra que sa valeur antitoxique était diminuée de quatre fois (de 1/600 de cent. cube à 1/150 de cent. cube) (1).

Animaux sensibilisés avec 1/100 de cent. cube de sérum antidysentérique (cheval 28) :

Eprouvés le 14 mars 1928 :

| | |
|---|------|
| Dose minima mortelle de sérum antidysentérique, en centimètres cubes. | 1/20 |
| Dose minima mortelle de sérum normal, en cent. cubes. | 1/20 |

A QUELLE FRACTION DU SÉRUM EST LIÉE LA SPÉCIFICITÉ?

Pour étudier cette question, nous avons pris le cas le plus marqué, au point de vue anaphylaxie, celui du sérum antidiphthérique vis-à-vis des animaux sensibilisés au sérum antidysentérique.

La sérumalbumine du sérum antidysentérique, qui est dépourvue d'anticorps (2), ne possède pas de spécificité anaphy-

(1) Les dosages du sérum antidysentérique et des fractions du sérum antidysentérique ont été faits par M. Sadik Mehmed que nous remercions.

(2) Nos recherches à ce sujet démontrent que l'antitoxine dysentérique est totalement liée à la pseudoglobuline ; la sérumalbumine en est dépourvue.

lactiques : elle présente la même toxicité pour les animaux qui sont sensibilisés avec du sérum antidysentérique que pour ceux qui sont sensibilisés avec du sérum antidiptérique.

Animaux sensibilisés avec 1/100 de cent. cube de sérum antidysentérique :

Eprouvés le 19 décembre 1927 :

| | |
|---|------|
| Dose minima mortelle de sérum antidysentérique, en centimètres cubes. | 1/40 |
| Dose minima mortelle de sérumalbumine antidysentérique, en centimètres cubes. | 1/10 |

Animaux sensibilisés avec 1/100 de cent. cube de sérum antidiptérique :

Eprouvés le 20 décembre 1927 :

| | |
|---|-------------|
| Dose minima mortelle de sérum antidiptérique, en centimètres cubes. | 1/40 |
| Dose minima mortelle de sérum antidysentérique, en centimètres cubes. | 1/15 à 1/20 |
| Dose minima mortelle de sérumalbumine antidysentérique, en centimètres cubes. | 1/10 |

Par contre, la sérumalbumine antidiptérique (1) possède la même spécificité que le sérum antidiptérique. Elle est plus toxique pour les animaux sensibilisés avec le sérum antidiptérique que la sérumalbumine du sérum normal. Elle est très peu toxique ou atoxique pour les animaux sensibilisés avec le sérum antidysentérique.

Animaux sensibilisés avec 1/100 de cent. cube de sérum antidiptérique :

Eprouvés le 31 octobre 1927 :

| | |
|--|------|
| Dose minima mortelle de sérum antidiptérique, en centimètres cubes. | 1/60 |
| Dose minima mortelle de sérum albumine antidiptérique, en centimètres cubes. | 1/18 |
| Dose minima mortelle de sérumalbumine normale, en centimètres cubes. | 1/3 |

(1) Cette sérumalbumine, comme on le sait, ne renferme pas d'anticorps.

Animaux sensibilisés avec 1/100 de cent. cube de sérum antidysentérique :

Eprouvés le 3 novembre 1927 :

| | |
|---|------|
| Dose minima mortelle de sérum antidysentérique, en centimètres cubes. | 1/40 |
| Dose minima mortelle de sérum antidiphthérique, en centimètres cubes. | 1/4 |
| Dose minima mortelle de sérumalbumine antidiphthérique, en centimètres cubes. | 1/2 |

TOXICITÉ ANAPHYLACTIQUE DES SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES.

La comparaison de toxicité des différents sérums, pour les animaux sensibilisés avec du sérum fortement antitoxique, nous montre que le sérum homologue à celui qui a servi à la sensibilisation est très toxique.

Dans le cas où le sérum sensibilisant n'avait pas de spécificité thérapeutique, les sérums que l'on emploie en injection déchaînant présentent la même toxicité.

En voici un exemple :

Les cobayes sont sensibilisés avec 1/100 de cent. cube de sérum normal de cheval, puis éprouvés, dix-huit jours après, avec différents sérums thérapeutiques :

| SÉRUM NORMAL en cent. cubes | SÉRUM antidysentérique en cent. cubes | SÉRUM antidiphthérique en cent. cubes | SÉRUM hémolytique en cent. cubes | SÉRUM antistreptococcique en cent. cubes | SÉRUM antidiphthérique en cent. cubes | SÉRUM antitoxigène en cent. cubes |
|--------------------------------|---|---|--|--|---|---|
| 1/120 Choc net. | 1/120 Choc net. | 1/120 Choc net. | 1/120 Choc net. | 1/120 Choc net. | 1/120 Choc net. | 1/120 Choc net. |
| 1/80 Choc mortel. | 1/80 Choc mortel. | 1/80 Choc mortel. | 1/80 Choc mortel. | 1/80 Choc mortel. | 1/80 Choc mortel. | 1/80 Choc mortel. |

Afin de se rendre compte de la toxicité effective des sérums, il faut, en plus de la spécificité anaphylactique, prendre en considération un autre facteur qui est le degré de sensibilisation. En voici un exemple :

| NATURE DU SÉRUM employé pour la sensibilisation | DOSE MINIMA MORTELLE DE SÉRUM, EN CENT. CUBES EN INJECTION DÉCHAINANTE | | | | | | |
|---|---|---------------------------|------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------|--------------|
| | Sérum antidiphthérique | Sérum antidysentérique | Sérum antitétanique | Sérum antirouget | Sérum antistreptococcique | *Sérum hémolytique | Sérum normal |
| Sérum antirouget | 1/10 | 1/5 | 1/10 | 1/20 | 1/10 | 1/5 | 1/10 |
| Sérum antistreptococcique. | 1/20 | 1/10 | 1/40 | 1/60 | 1/80 | 1/40 | 1/20 |

La spécificité sensibilisante des sérums thérapeutiques est manifeste ; le sérum antirouget est, de tous les sérums éprouvés, le plus toxique pour les animaux sensibilisés avec ce sérum. Mais, fait intéressant, ce sérum se montre plus toxique chez les animaux sensibilisés avec le sérum antistreptococcique.

Cela tient à ce que le degré de la sensibilisation n'est pas le même pour les deux séries d'animaux : les animaux, préparés avec du sérum antistreptococcique, sont plus fortement sensibilisés que ceux préparés avec du sérum antirouget. La dose minima mortelle du sérum antistreptococcique pour les animaux sensibilisés avec le même sérum est de 1/80 de cent. cube ; la dose minima mortelle du sérum antirouget pour les animaux sensibilisés avec ce dernier est seulement de 1/20 de cent. cube. Nous en concluons que dans le cas envisagé le sérum antistreptococcique sensibilise quatre fois plus fortement que le sérum antirouget.

L'ANTIANAPHYLAXIE DES SÉRUMS THÉRAPEUTIQUES.

Dans un Mémoire précédent, nous avons montré qu'il est possible d'obtenir régulièrement l'antianaphylaxie sans qu'elle soit précédée d'un choc.

Les études sur la spécificité anaphylactique des sérums thérapeutiques nous ont apporté un nouvel exemple d'antianaphylaxie sans choc, laquelle serait même plus solide que celle qui suit le choc.

Les animaux sensibilisés avec le sérum antidysentérique ont

été éprouvés, d'une part, par ce même sérum, très toxique, et, d'autre part, par le sérum antidiphthérique, dix à quinze fois moins toxique.

La dose précurative du sérum antidysentérique donne lieu, chez ces animaux, à une antianaphylaxie moins solide que celle conférée par le sérum antidiphthérique.

C38. Epruvé avec 1/80 de centimètre cube de sérum antidysentérique] : *Choc léger.*

Réinjecté une heure après avec 2 doses mortelles de sérum antidysentérique (1/20 de centimètre cube) : *Choc léger, dyspnée.*

Le sérum antidiphthérique était, pour ces animaux, toxique seulement à la dose de 1/4 à 1/2 cent. cube.

C39. Epruvé avec 1/4 de centimètre cube de sérum antidiphthérique : *Dyspnée et malaise prononcé.*

C40. Epruvé avec 1/2 centimètre cube de sérum antidiphthérique : *Choc mortel.*

Les animaux qui ont reçu le sérum antidiphthérique à des doses ne produisant pas de choc présentent une antianaphylaxie très solide :

C32. Epruvé avec 1/40 de centimètre cube de sérum antidiphthérique : *Pas de symptômes.*

Réinjecté une heure après avec 4 doses mortelles de sérum antidysentérique (1/10 de centimètre cube) : *Pas de choc.*

C42. Epruvé avec 1/20 de centimètre cube de sérum antidiphthérique : *Pas de symptômes.*

Réinjecté une heure après avec 4 doses mortelles de sérum antidysentérique (1/10 de centimètre cube) : *Pas de choc.*

C31. Epruvé avec 1/8 de centimètre cube de sérum antidiphthérique : *Pas de choc.*

Réinjecté une heure après avec 20 doses mortelles de sérum antidysentérique (1/2 centimètre cube) : *Choc léger, malaise et dyspnée.*

Les différences de toxicité entre le sérum homologue (celui qui a servi à la sensibilisation) et les autres sérums sont en général plus petites. Ces différences sont en tout cas insuffisantes pour obtenir d'emblée une antianaphylaxie aussi solide que celle indiquée dans l'expérience citée.

Nous avons déjà dit que les sérums normaux³ sont deux à cinq fois moins toxiques que les sérums homologues. On réussit à diminuer encore leur toxicité de deux à trois fois par

un chauffage d'une heure à 56° pendant quatre jours consécutifs (1).

Animaux sensibilisés avec 1/100 de centimètre cube de sérum antitétanique :

Eprouvés le 5 mars 1928 :

| | |
|---|---------|
| Dose minima mortelle de sérum antitétanique frais, en centimètres cubes | 1/40 |
| Dose minima mortelle de sérum normal frais, en centimètres cubes | 1/8 |
| Dose minima mortelle de sérum normal chauffé, en centimètres cubes | 1/3-1,4 |

La toxicité du sérum normal chauffé est donc dix fois plus faible que celle du sérum spécifique homologue, qui a servi à la sensibilisation.

Il y a cependant des cas où le chauffage ne diminue pas d'une façon appréciable la toxicité des sérums normaux (2).

Animaux sensibilisés avec 1/100 de centimètre cube de sérum antitétanique :

Eprouvés le 25 avril 1928 :

| | |
|---|------|
| Dose minima mortelle de sérum antitétanique, en centimètres cubes. | 1/80 |
| Dose minima mortelle de sérum normal frais, en cent. cubes. | 1/16 |
| Dose minima mortelle de sérum normal chauffé, en centimètres cubes. | 1/16 |

Dans ce cas, le sérum normal est, avant et après le chauffage, quatre à cinq fois moins toxique que le sérum correspondant à la sensibilisation.

ESSAIS DE MODIFIER LES FONCTIONS SENSIBILISANTE ET TOXIQUE DU SÉRUM.

Nous avons vu que l'injection de toxines microbiennes confère au sérum des animaux en immanisation une spécificité anaphylactique. Ce fait nous incita à rechercher si l'injection de

(1) Méthode proposée par Besredka pour diminuer la toxicité des sérums thérapeutiques; cette diminution de la toxicité ne modifie pas les propriétés antianaphylactiques du sérum.

(2) La cause de cette irrégularité d'action du chauffage nous est encore inconnue.

substances chimiques, douées d'affinité pour les protéines, produirait dans le sérum des modifications encore plus marquées au point de vue de l'anaphylaxie.

Dans ce but, nous avons choisi les arsénobenzènes dont l'affinité pour les protéines est bien connue.

L'arsénobenzène *in vitro* ne modifie pas la toxicité du sérum dans lequel il est dissous.

L'arsénobenzol injecté au lapin, par la voie intraveineuse, modifie sensiblement la toxicité de son sérum pour les animaux sensibilisés avec du sérum normal.

Un lapin de 2 kilogrammes reçoit 0 gr. 50 d'arsénobenzène ; il est saigné à blanc huit heures après l'injection. Son sang se coagula seulement au bout de plusieurs heures.

Voici quelle fut la toxicité du sérum de ce lapin, avant et après l'injection d'arsénobenzène :

| | |
|---|-------|
| Dose minima mortelle du sérum avant l'injection, en centimètres cubes | 1/3 |
| Dose minima mortelle du sérum après l'injection, en centimètres cubes | 1 3/4 |

Les animaux ayant reçu de ce sérum ainsi modifié, à une dose ne donnant pas de choc, acquièrent une antianaphylaxie marquée.

C30. Eprouvé avec 1/2 centimètre cube de sérum de lapin modifié : *Pas de symptômes.*

Réinjecté une heure après avec 5 doses mortelles de sérum normal : *Pas de choc.*

En raison de son faible pouvoir sensibilisant, le sérum de lapin est peu approprié pour ces expériences d'antianaphylaxie. Il faudrait l'injecter à de très hautes doses (2-3 cent. cubes).

Nous avons porté ensuite nos essais sur le sérum de poule, qui est doué d'un fort pouvoir sensibilisant.

Le sérum de poule, après l'injection d'arsénobenzène, diminue sensiblement de toxicité.

Une poule de 3 kilogrammes reçoit dans la veine 0 gr. 5 d'arsénobenzène (1); on la saigne huit heures après. Le sang est coagulé seulement au bout de deux jours.

(1) Arsénobenzène du groupe 914.

La toxicité du sérum normal (mélange de sérums de 4 poules) et la toxicité du sérum, après l'injection d'arsénobenzène, sont dosées sur des cobayes sensibilisés avec du sérum normal.

| | |
|---|------|
| Dose minima mortelle de sérum normal, en cent. cubes . . | 1/25 |
| Dose minima mortelle de sérum après l'injection d'arsénobenzène, en centimètres cubes | 1/4 |

Ce sérum subit encore une nouvelle diminution de sa toxicité par un chauffage de une heure à 56°, répété quatre jours consécutifs.

| | |
|---|------|
| Dose minima mortelle du sérum normal, en cent. cubes . . | 1/25 |
| Dose minima mortelle du sérum chauffé d'animaux traités, en centimètres cubes | 1/2 |

Les animaux qui ont reçu ce sérum, à des doses ne produisant pas le choc, résistent une heure après l'épreuve à la réinjection de 5 à 20 doses mortelles de sérum normal de poule.

C67. Epruvé avec 1/4 de sérum chauffé de poule traitée : *Pas de choc*.
Réinjecté une heure après avec 1/4 de centimètre cube de sérum normal (5 doses mortelles) : *Pas de choc*.

C57. Epruvé avec 1/4 de centimètre cube de sérum chauffé d'animaux traités : *Pas de choc*.
Réinjecté une heure après avec 1 centimètre cube de sérum normal (20 doses mortelles) : *Choc léger, malaise*.

Nous avons ainsi un nouvel exemple d'antianaphylaxie très solide, non précédée de choc.

CONCLUSIONS.

Dans l'anaphylaxie sérique, à côté de la spécificité d'espèce, il existe une spécificité correspondant à la nature thérapeutique des sérums. Cette spécificité se traduit par la toxicité inégale des sérums thérapeutiques vis-à-vis des animaux sensibilisés avec l'un de ces sérums.

Le sérum thérapeutique qui a servi à la sensibilisation est celui qui est le plus toxique.

Tous les sérums thérapeutiques ont la même toxicité pour les animaux sensibilisés avec du sérum normal.

La spécificité des sérums thérapeutiques est, jusqu'à un certain degré, en rapport avec la valeur antitoxique des sérums. Elle est liée, dans le sérum antidysentérique, aux globulines. Dans le sérum antidiphthérique, elle est aussi liée à l'albumine.

Ces différences de toxicité qu'offrent les sérums thérapeutiques permettent d'obtenir l'antianaphylaxie sans choc.

L'introduction d'un produit chimique (arsénobenzène) dans la circulation modifie la toxicité anaphylactique du sérum; ce dernier devient moins toxique pour les animaux sensibilisés avec du sérum normal.

(Institut Pasteur.)

LA THEILÉRIOSE DES BOVIDÉS EN ASIE CENTRALE,

par G. OBOLDOUEF, directeur et J. GALOUZO, premier assistant.

(*Institut bactériologique-vétérinaire de U.S.S.R.,
Tachkent.*)

La theilériose des bovidés cause de grands ravages en Asie Centrale non seulement parmi les vaches de races importées de la Russie d'Europe, mais également parmi les animaux indigènes amenés de Siémiretschié et de la Chine occidentale (Kouldja).

Le germe de la theilériose des bovidés en Asie Centrale a été peu étudié et jusqu'à maintenant on l'attribuait à *Th. parva* (par exemple Yakimoff). En Transcaucasie, il y a plus de vingt ans, Dschunkowsky et Luhs, dans leurs descriptions de la theilériose, ont distingué deux formes de la maladie : aiguë et chronique (cachectique) et ont nommé le parasite *Theileria annulata*; dans la maladie chronique, ils ont trouvé un parasite punctiforme.

On sait que ces observations et descriptions ont donné lieu à des objections aux Congrès internationaux de Budapest et de La Haye. Aujourd'hui certains auteurs, comme par exemple le professeur Yakimoff, supposent que Dschunkowsky et Luhs ont eu affaire à un mélange de theilériose et d'anaplasmose; cette opinion, assez fondée du reste, exige cependant d'être vérifiée.

Au Turkestan, la theilériose des bovidés se rencontre sous les formes aiguë et chronique, et le parasite de cette dernière (chronique) est *Theileria* (*Gonderia*) *mutans*.

La différence donnée par E. Brumpt et A. Theiler entre la *Gonderia mutans* et les autres *Theileria* est douteuse; nos propres observations et expériences sur ce parasite confirment l'observation de E. Brumpt en ce qui concerne la présence de corps plasmatiques dans les ganglions lymphatiques et une

crise aiguë de la maladie; nous les publierons après avoir obtenu un matériel plus complet.

La gondériose (*G. mutans*), qui n'est pas remarquable dans son cours clinique, n'a pas pu attirer l'attention des praticiens vétérinaires du Turkestan; par contre la forme aiguë a toujours été l'objet de leur attention, mais ils n'ont pas eu la possibilité matérielle d'étudier cette maladie par l'expérience. Dès les premiers jours de sa fondation (vers le milieu de 1924), notre Institut a étudié les maladies infectieuses du sang des bovidés et avant tout la piroplasmose (*P. bigeminum*) et ce n'est qu'à la fin de 1926 qu'il a pu entreprendre l'étude de la theilériose.

Nous regrettons vivement de n'avoir pas connu, en commençant nos recherches, les excellents travaux des auteurs algériens sur la theilériose de l'Afrique du Nord (*T. dispar*). Un de nous (G. Oboldouef) n'en a eu connaissance qu'en août 1927, à la bibliothèque de l'Institut vétérinaire expérimental de Moscou. Beaucoup de nos expériences auraient été simplifiées et auraient donné des résultats plus précis et plus rapides.

Le 15 novembre 1926, nous avons reçu de l'abattoir de Tachkent les ganglions lymphatiques d'un taureau, chez lequel le vétérinaire, P. Paroïsky (qui y travaille depuis quinze ans), en examinant la viande, avait observé des traces de theilériose (hémorragies dans les cellules sous-cutanées du dos, dans l'épicarde, œdème des ganglions, ulcérations de la muqueuse de la caillette).

L'examen microscopique des frottis des ganglions, colorés suivant Giemsa ou Leishman, ont montré une masse de corps plasmatiques de Koch. De petits morceaux de ganglions broyés avec une solution physiologique ont donné une émulsion qui a été injectée dans les ganglions lymphatiques de 2 bêtes de deux ans à deux ans et demi : la génisse 144 et le taureau 145, amenés avec 12 autres bovidés en septembre 1926 de Pischpek (actuellement Trounze) en Khirgisie où les vétérinaires n'ont pas observé de cas de theilériose; cependant nous devons reconnaître que là les services vétérinaires sont mal organisés. Ces bovidés ont été amenés par chemin de fer et ne sont plus sortis de la cour de notre Institut, où ils ont été l'objet d'observations pendant les mois d'octobre et novembre.

Leur température était normale et leur santé bonne en apparence. Cependant l'examen des frottis du sang périphérique a montré chez tous des formes rondes et ovoïdes de *G. mutans*.

Douze jours après l'injection, l'examen des frottis des sucres des ganglions lymphatiques de la génisse 144 a montré la présence de corps plasmatiques de Koch; la température de l'animal est encore normale trois jours plus tard; le 1^{er} décembre, la température est déjà de 40°; le 3 décembre, température, 41°6, grande quantité de corps plasmatiques, beaucoup de parasites dans les hématies du sang périphérique, Hb 68 p. 100; 4 décembre, température, 41°7; l'animal mange et boit, les muqueuses sont pâles; dans les frottis des ganglions, encore plus de corps plasmatiques de Koch, moins dans les frottis de la rate; dans les hématies quantité de theiléries de différentes formes : ovales, bacilliformes, 4 à 2 parasites dans chaque globule. Le 7 décembre, température 41°1, l'animal est faible, ne boit pas, beaucoup de corps plasmatiques dans les hématies, des parasites ovoïdes, 1 à 3 par globule; Hb 23 p. 100; pétéchiés dans les muqueuses de l'œil et du vagin; le 10 décembre, l'animal meurt.

Autopsie : petites hémorragies dans le tissu conjonctif sous-cutané du dos; œdème dans la région de l'omoplate gauche; autour du ganglion précapsulaire gauche, œdème jaune; dans le ganglion, hémorragies de 5 millimètres de diamètre; le ganglion droit (place de l'infection) est grossi, œdémateux; leur tissu est poreux. Hémorragies sur les muqueuses du larynx et sur les parties supérieures de la trachée. Les muscles du cœur sont poreux et comme bouillis; faibles hémorragies punctiformes sous l'endocarde. Le foie est de couleur ocre sur les coupes; la rate est rouge foncé, tendre, à bords arrondis; la pulpe de la rate reste collée au couteau. Les reins sont œdémateux, jaunâtres. Dans la caillette, beaucoup d'ulcérations blanchâtres, dont plusieurs à fond jaune. Les vaisseaux du mésentère gonflés. Vessie normale; urine jaune clair. Au microscope, beaucoup de corps plasmatiques dans les frottis des ganglions et moins dans la rate.

Chez le taureau 145, on a trouvé, onze jours après l'infection, des corps plasmatiques dans les ganglions précapsulaires avec température normale; le 29 novembre, le quatorzième jour

après l'infection, température 40°, corps plasmatiques; le 3 décembre, température, 40°5, corps plasmatiques dans les frottis des ganglions, rares parasites dans les hématies; 6 décembre, température normale, les corps plasmatiques se rencontrent encore; 9 décembre, température normale, pas de corps plasmatiques, l'animal est en voie de guérison.

Le matériel virulent de la première génisse 144 sert à nos expériences ultérieures.

La première émulsion des ganglions lymphatiques a été tout d'abord introduite dans le ganglion lymphatique de l'animal pour obtenir une infection plus sûre; ensuite pour l'infection nous avons employé l'émulsion de la rate et enfin simplement du sang défibriné. Outre l'infection par les ganglions, nous avons employé l'infection sous-cutanée. Dans tous les cas, le matériel d'infection a été pris sur des animaux sérieusement malades, pendant leur vie ou immédiatement après la mort. Avec ces trois matériaux servant à l'infection, et les deux procédés d'infection, on a obtenu des résultats positifs.

Le but de nos expériences était d'étudier la maladie même, son germe et les moyens d'immunité artificielle, ainsi que la vérification, après la maladie expérimentale, de l'immunité des infections naturelles aux champs.

Au commencement de nos travaux, nous avons fait deux hypothèses : 1° sur la possibilité d'un affaiblissement du virus de la theilériose en passant d'un taureau à un autre, avant la période du développement sexuel dans la tique, ce que nous avons par exemple avec *P. bigeminum*, et 2° sur la possibilité d'obtenir un vaccin actif antitheilériose en se basant sur les renseignements que nous avons alors sur la véritable immunité qui suit la vraie theilériose (*T. parva*).

Nous pouvons expliquer les résultats négatifs obtenus avec un vaccin semblable par R. Koch et Dschunkowsky de ce qu'ils ont pris comme antigène du sang d'animaux, abondant en formes inactives de parasites de la theilériose dans les hématies. Ce vaccin ne devait pas agir fortement sur les formes primordiales du parasite, les corps plasmatiques, et de cette manière arrêter le progrès de la maladie. Dans nos expériences, pour obtenir un vaccin antitheilériose, nous avons pris justement la forme primordiale du parasite (agamontes de

Gonder) sous forme de corps plasmatiques, dans une émulsion des ganglions lymphatiques. Nous espérons obtenir une action préventive ou médicale en employant ce vaccin au commencement même de la maladie. Si le vaccin donnait même un faible résultat positif, nous pensions l'essayer encore contre la theilériose associée.

Pour nos expériences, en neuf mois et demi, du 15 novembre 1926 au 1^{er} septembre 1927, nous avons eu 45 bêtes adultes et 17 veaux. 14 bêtes adultes provenaient de la région montagneuse du Kirghistan, au sud de Pischpek et 31 du Kasakstan, au nord-est de Pischpek; ces dernières bêtes ont été reçues en plusieurs fois, donc proviennent de différents troupeaux, amenés à Tachkent pour l'abattoir.

Dans nos expériences, nous avons pu remarquer que notre virus n'avait pas eu la même influence sur tous les animaux amenés de la République Kasaque, certains n'ont pas été infectés par la theilériose expérimentale, de même qu'ils ne l'ont pas été par la theilériose naturelle; il est possible que, dans leur pays d'origine, la theilériose existe cependant et que ces animaux en aient été malades. Au Turkestan, la répartition géographique de la theilériose et de la piroplasmose n'a pas été établie jusqu'à maintenant.

Parmi les 15 veaux indigènes, âgés d'un an environ, dont la plupart ont été en pâture en été, 10 ne se sont pas infectés, 4 ont été légèrement malades et 1 seul fortement, et c'est de lui que nous avons pris le matériel nécessaire à nos infections ultérieures.

De 45 animaux adultes, 33 ont été infectés dès la première fois et 12 ne l'ont pas été. Sur les 33 malades, tous d'une forme aiguë, 16 ont guéri, 13 ont péri et 4 ont été abattus faute d'espoir. Sur les 45 animaux, 29 ont été infectés par l'émulsion des ganglions lymphatiques, 12 par l'émulsion de la rate et 4 par du sang défibriné. Ces trois produits ont donné l'infection. Quant à la voie d'entrée, 38 ont été infectés directement dans le ganglion, 5 sous la peau et 2 simultanément dans le ganglion et sous la peau. L'infection sous-cutanée a également donné des résultats positifs, même avec du sang défibriné (animaux 208, 214, 134, 136).

On leur a pris la température tous les jours et, pendant la

période d'incubation, on a observé l'extrait des ganglions et le sang au microscope, et quand la maladie a été découverte l'examen des extraits des ganglions et quelquefois de la rate a eu lieu chaque jour. Trois fois une forte épizootie de fièvre aphteuse a arrêté nos expériences.

D'après nos observations sur 34 animaux, on a trouvé des corps plasmatiques au plus tôt le douzième jour et au plus tard le trente et unième jour après l'infection, donc comme moyenne le dix-septième ou dix-huitième jour. C'est cette période qu'il faut considérer comme étant le délai d'incubation pour la découverte du germe de la maladie. Comme règle, on peut considérer que l'augmentation de T° survient le deuxième ou troisième jour après l'apparition des corps plasmatiques. Ainsi la température de 40°, comme nous l'avons vu plus haut, apparaît le quatorzième jour au plus tôt et le vingt-huitième au plus tard après l'infection, en moyenne le vingtième jour (conclusion basée sur 28 expériences).

Le délai d'incubation est encore plus long quant à l'apparition d'une grande quantité de parasites dans le sang. D'après les observations faites sur 11 animaux, le délai minimum est de dix-huit jours et le maximum trente et un jours, comme moyenne vingt et un jours. Il est à remarquer que le nombre des parasites dans le sang a été faible chez tous les animaux expérimentés, même jusqu'à la mort ou jusqu'au rétablissement. Quelques rares parasites ont été considérés comme des *G. mutans*.

Dans quelques rares cas, des corps plasmatiques ont été trouvés dans le sang périphérique.

Quant à la durée de l'existence des trois symptômes cités de la maladie : corps plasmatiques, température élevée et formes endoglobulaires, nous pouvons donner le tableau suivant.

Pendant les premiers jours de la maladie, après la découverte de corps plasmatiques et l'élévation de la température, il n'y a pas d'autres symptômes cliniques : la bête mange, boit, est gaie; plus tard les battements de cœur sont plus fréquents, affaiblissement de la respiration, les paupières enflent, les yeux sont à demi ouverts et pleurent; sur les conjonctives, petites pétéchies, de même que sur les muqueuses des organes sexuels; la bête est le plus souvent couchée, le rétablissement vient

lentement, l'appauvrissement du sang en hémoglobine est parfois grand, de 60 à 75 p. 100, la quantité d'hémoglobine tombe à 15 ou 20 p. 100.

| | NOMBRE DE JOURS | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|---------|---------|---------------------------------------|---------|---------|-----------------------------------|---------|---------|
| | Corps plasmatiques | | | Température de 40° et au-dessus | | | Parasites dans les hématies | | |
| | Minimum | Maximum | Moyenne | Minimum | Maximum | Moyenne | Minimum | Maximum | Moyenne |
| Animaux guéris | 2 | 8 | 5,5 | 2 | 9 | 4,5 | 2 | 5 | 3,3 |
| Animaux morts | 4 | 9 | 7,6 | 4 | 14 | 7,8 | 2 | 6 | 3,7 |
| Moyenne | 2 | 9 | 6,5 | 2 | 14 | 6,2 | 2 | 6 | 3,5 |

A la description de l'autopsie, nous devons ajouter que les hémorragies ne se limitent pas aux cellules sous-cutanées du dos; elles atteignent jusqu'à l'épaisseur des muscles, qui, eux-mêmes, sont poreux et pâles. Outre les hémorragies du larynx et de la trachée, on en remarque souvent dans les bronches, et elles sont parfois si fortes qu'elles se touchent; il y en a aussi dans la plèvre costale. Sur la surface du foie, il y a des taches blanches et dans le parenchyme de petites hémorragies. La surface du rein est couverte de nodosités blanc jaunâtre, de la grosseur d'un grain de lentille. Sur les parois du bassin et de la vessie, il y a des hémorragies. Il se trouve des corps plasmatiques dans les frottis du foie, de la rate, dans les ganglions lymphatiques, dans le rein, et plus rarement dans le cœur, les poumons, le cerveau, etc; on en rencontre dans le sang périphérique. Dans les globules rouges du sang, on trouve, en quantités variables, de petits parasites ronds, ovoïdes, bacilliformes, en virgule, etc.

Nous avons essayé de soigner les animaux malades avec le sérum du sang de taureaux qui, après avoir supporté la theilériose, ont été à plusieurs reprises infectés à nouveau avec une grande quantité d'émulsion des ganglions lymphatiques.

Sur 17 bêtes malades soignées avec le sérum antitheilériose,

10 se sont rétablies et 7 sont mortes. Nous pouvons considérer comme preuve de l'effet positif du sérum la diminution ou la complète disparition des corps plasmatiques, l'abaissement de la température après l'emploi du sérum (au plus tard le jour suivant). Cependant le nombre de ces observations étant faible, il est nécessaire de les répéter. — Plus haut nous avons dit qu'une partie des bêtes n'étaient pas tombées malades après l'infection par un matériel absolument virulent. Il y a dans ce nombre des veaux indigènes et des animaux adultes amenés du Kasakstan et de la Chine occidentale (Kouldja). 9 bêtes adultes et 7 veaux de ce groupe ont subi une seconde injection de matière theilérique. Un seul animal (n° 135) a été infecté de cette manière par la theilériose expérimentale et est mort. Les autres n'ont donné aucune réaction, de même que les 12 animaux rétablis après la première infection et 2 animaux qui ont été malades de la theilériose naturelle l'année précédente. Nous pouvons supposer que les 9 bêtes du Kasakstan et de la Chine occidentale n'ont pas été infectées pour une même raison que les veaux indigènes et 12 + 2 animaux d'expérience. Il est probable que les 9 du Kasakstan ont eu la maladie auparavant.

Au milieu de l'été, nous avons fait des expériences de contrôle (vérification) sur l'infection par la theilériose naturelle sur différents groupes d'animaux :

a) 16 bêtes adultes rétablies de la theilériose expérimentale en hiver et au printemps 1927;

b) 3 bêtes adultes rétablies de la theilériose naturelle l'année précédente;

c) 4 veaux rétablis de la theilériose expérimentale en 1927;

d) 9 bêtes adultes n'ayant pas été malades après la première infection expérimentale;

e) 18 animaux adultes de contrôle (témoins) vaccinés seulement contre *P. bigeminum*.

f) 8 bêtes adultes de contrôle (témoins), saines, non vaccinées contre *P. bigeminum*.

Tous ces animaux ont été mis en pâture près de Tachkent pendant trois mois, du commencement de juin jusqu'au 1^{er} septembre, dans un pâturage infecté de theilériose (par des tiques). Un médecin vétérinaire les observait tous les jours

et mesurait leur température de grand matin, car celle du soir après la chaleur n'aurait pas été juste. Quand la température dépassait la normale, on examinait au microscope les frottis du sang de l'oreille et des extraits des ganglions lymphatiques.

Sur 29 bêtes des groupes *a*, *b*, *c*, *d*, une seule est tombée malade et les symptômes de la maladie n'étaient pas clairs. Sur 26 bêtes (18 *e* + 8 *f*), 20 (15 *e* et 5 *f*) sont tombées malades de la theilériose naturelle et 11 (8 *e* et 3 *f*) sont mortes. La différence de maladie entre les animaux vaccinés ou plus exactement ayant supporté l'infection expérimentale et les autres bêtes de contrôle, saines, est si grande que, pour un but pratique, il est nécessaire de faire des expériences avec notre theilériose d'après le mode des auteurs algériens.

Quel est le virus de la theilériose du Turkestan? D'après ces premières données, il se rapproche beaucoup du *T. dispar* des auteurs algériens. L'année dernière nous n'avons pas eu la possibilité de séparer notre theilériose de la gondériose et de trouver le virus propre de la theilériose du Turkestan; nous essayerons de le faire en 1928.

Les animaux employés pour étudier la theilériose ont été auparavant porteurs de *G. mutans*. L'observation sur plusieurs d'entre eux pendant plusieurs mois n'a montré que de rares *Gonderia* dans les frottis du sang, et cela n'a pas pu avoir une influence importante sur l'examen microscopique du sang infecté de theilériose. D'un autre côté, le cours de nos expériences sur la theilériose a été si juste et si uniforme, que nous sommes en droit de faire une comparaison provisoire entre l'infection du sang par différentes formes de parasites de la theilériose du Turkestan et d'autres theilérioses, suivant les données et la répartition des formes du parasite des savants algériens.

Pour la comparaison, nous avons pris les frottis de différents animaux à différentes périodes de la maladie.

La theilériose du Turkestan se rapproche encore de celle de l'Afrique du Nord par d'autres particularités et, pour savoir si nous avons affaire à deux espèces de theilériose ou à une seule, il est nécessaire de faire des observations supplémentaires et des comparaisons expérimentales directes.

Pourcentage des différentes formes de theilériose sur le nombre entier des parasites se trouvant dans les globules rouges du sang.

| | FORMES d'anaplasmes | RONDES | OVALES | BACILLIFORMES | FORMES de virgules | DIVISION en croix |
|-----------------------------------|------------------------|--------|--------|---------------|-----------------------|----------------------|
| <i>T. mutans</i> | 0,4 | 20,0 | 36,3 | 42,0 | — | 2,0 |
| <i>T. parva</i> | 2,2 | 42,3 | 3,8 | 81,4 | — | 0,3 |
| <i>T. dispar</i> | 0,7 | 50,0 | 41,6 | 4,0 | 3,5 | 0,2 |
| <i>Th.</i> du Turkestan | 1,0 | 43,0 | 47,2 | 6,6 | 2,0 | 0,2 |

Nous avons appelé le germe de la theilériose *T. turkestanica* sous toute réserve, jusqu'à éclaircissement complet de sa nature et de sa ressemblance avec les autres formes de theilériose déjà décrites. Nous supposons également que *T. annulata*, décrite il y a plus de vingt ans par Dschunkowsky et Luhs en Transcaucasie, ne doit pas différer sensiblement du germe de la theilériose du Turkestan. Nous prenons en considération le voisinage géographique et l'analogie du climat des deux pays. La theilériose de la Transcaucasie et celle du Turkestan doivent être soumises à une étude nouvelle et détaillée suivant le programme adopté dans leurs travaux par les savants algériens, et alors seulement nous pourrions éventuellement être fixés sur la question de l'existence de trois formes de germes de la theilériose (non compris la *T. parva*), savoir *T. dispar*, *annulata* et *turkestanica*, ou si ce n'est qu'une seule et même forme.

ESSAIS DE PRÉMUNITION CONTRE LA TUBERCULOSE BOVINE PAR LE BCG

par A. DE ASSIS (Institut Vital Brazil, Niteroi)
et Oct. DUPONT (École Supérieure d'Agriculture et Médecine Vétérinaire
de Rio de Janeiro).

Il y a quelques années l'un de nous (Oct. Dupont), appelé pour combattre un foyer de charbon bactérien dans une étable de l'État de Rio de Janeiro, eut l'occasion de constater sur le bétail laitier dont il s'agit des manifestations multiples de tuberculose, pulmonaires surtout, ganglionnaires et même des mammites (1). Issus de croisements divers, Hollandais, Switz et Devon, les représentants de cette dernière race surtout présentaient des formes sévères de la maladie.

Après avoir sacrifié un lot de vaches séparé par l'examen clinique, nous avons tuberculinisé le restant du bétail adulte. Malgré les belles apparences de celui-ci, un grand nombre de réactions positives a confirmé la dissémination intense de l'infection tuberculeuse. Plus tard, l'épreuve de la tuberculine pratiquée sur les génisses nous a donné plus de 80 p. 100 de réactions positives et ce lot fut ensuite isolé dans un pré, dans les environs de la propriété, soumis au régime intensif, ses produits étant dans la suite vaccinés avec le BCG, à l'occasion des naissances.

Le bétail adulte, qui comptait encore 70 unités, a été réduit à 40 par la suppression de 30 vaches qui présentaient des réactions positives et des signes cliniques de tuberculose. En même temps, la méthode prophylactique de Bang fut proposée et appliquée, mais la pratique de son exécution venait se heurter à chaque pas aux difficultés les plus variées.

(1) Au Brésil, la tuberculose existe avec fréquence parmi le bétail laitier des étables, peu nombreux, d'ailleurs, en comparaison avec le bétail à viande, lequel est au nombre de plus de 30 millions vivant toute l'année dans les champs et parmi lequel la tuberculose est excessivement rare.

Entre temps, l'Institut Vital Brazil venait de recevoir (1925) un échantillon de BCG, issu du laboratoire du professeur A. Calmette, par l'intermédiaire du Dr J.-E. Moreau, de Montevideo. Après les premières vérifications expérimentales confirmant l'innocuité de ce germe pour les petits rongeurs de laboratoire, nous avons commencé, dans cet élevage infecté, la vaccination des nouveau-nés, en nous conformant aux prescriptions de Calmette et Guérin (1) : inoculation sous-cutanée d'émulsions récentes de BCG aux jeunes veaux de moins de quinze jours, pour les laisser ensuite en contact avec des animaux tuberculeux.

Quelque temps après le début de nos essais, des résultats favorables et encourageants ont été publiés par Guérin, Richart et Boissière (2) sur la prophylaxie de la tuberculose bovine dans une exploitation infectée, à Gruville, en suivant les mesures prophylactiques indiquées par les auteurs précédents.

Nos expériences de vaccination ont été commencées en avril 1926 et nous ont permis d'observer minutieusement jusqu'à ce jour 45 veaux, dont la plupart ont été réinoculés une ou plusieurs fois. Nos premières vérifications et les résultats encourageants que nous venons d'obtenir nous serviront de comparaison désormais avec ceux que nous obtiendrons en suivant une *orientation prophylactique plus rigoureuse*.

La grande diffusion de la tuberculose parmi les bovins qui font l'objet de cette étude (80 p. 100 de réactions tuberculiniques positives, 30 p. 100 des animaux avec manifestations cliniques non douteuses, chaque année) nous a dispensé de la nécessité des témoins dans cette expérience. Nous avons donc vacciné indistinctement tous les nouveau-nés, réservant pour le futur une contre-épreuve avec des non-vaccinés, dans le cas où tous les vaccinés auraient échappé à l'infection en milieu contaminé. Dans cet essai de vaccination par le BCG, nous avons eu avant tout l'intention de rechercher s'il est possible d'enrayer la tuberculose chez les bovins exclusivement par le jeu des naissances et par le vaccin, tout en conservant un contact

(1) Ces *Annales*, mai 1924, p. 371.

(2) *Ibid.*, mars 1927, p. 233.

permanent et étroit des jeunes vaccinés avec le bétail infecté et sans apporter aucun soin spécial à son allaitement, qui a été toujours naturel, ou à son alimentation postérieure.

Dans notre pratique, le BCG a été injecté, dans la grande majorité des cas, dans les quinze premiers jours après la naissance. Plusieurs veaux ont reçu le vaccin à peine âgés de vingt-quatre à quarante-huit heures; deux ont été vaccinés en dehors du délai de quinze jours. L'inoculation a toujours été pratiquée dans le tissu cellulaire du pli du fanon.

Au début, notre vaccin était préparé avec des cultures sur pomme de terre glycinée; dans la suite, le nombre des vaccinations devenant de plus en plus grand, nous avons pensé à utiliser les cultures en milieu de Sauton, âgées de quinze à vingt-cinq jours. Les germes, essorés entre deux feuilles de papier buvard stérile et pesés aseptiquement, étaient dissociés à sec avec billes de verre, dans un flacon stérile et mélangés à des quantités progressivement croissantes du liquide glucosé et glyciné de Calmette, jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chaque centigramme de BCG a été suspendu dans 2 cent. cubes de liquide.

Le tableau ci-après (I) donne les renseignements sur les détails des vaccinations et revaccinations que nous avons pratiquées.

Il démontre que la dose de BCG la plus fréquemment employée a été celle de 50 milligrammes; deux fois elle n'a été que de 25 milligrammes et trois fois de 30 milligrammes pour la première vaccination. Plus récemment, les doses employées ont passé graduellement à 60, 80, 90 et 100 milligrammes, pour les vaccinations comme pour les revaccinations.

Les réactions locales déterminées par ces différentes doses sont à peu près identiques, variant cependant parfois d'un animal à l'autre et évoluant sous la forme d'une infiltration diffuse et chaude au début, mais qui se circonscrit peu à peu pour former un petit nodule dur, qui disparaît au bout de quelques mois. Dans la première vaccination, les réactions locales sont moins accusées que dans les réinoculations; chez un petit pourcentage des vaccinés et revaccinés, il s'est produit un abcès à l'endroit de l'injection.

Nous n'avons pas observé de signes cliniques d'une réaction générale (la température n'ayant pas été surveillée), ni le moindre accident qu'on eût pu attribuer à un retour du BCG à sa virulence primitive. Au contraire, tous les vaccinés ont présenté un développement excellent, bien supérieur, en moyenne, à celui des animaux élevés à l'époque antérieure à la vaccination, dans la même étable.

Après cette confirmation de l'innocuité du BCG pour les jeunes bovins, même avec de hautes doses administrées par voie sous-cutanée (la génisse n° 6 a reçu 315 milligrammes de germes en moins de deux ans), nous avons été amenés à étudier les effets de la prémunition dans les conditions énumérées plus haut.

Nous avons donc fait abattre 6 bouvillons vaccinés avec des doses variées à des époques diverses et dont deux avaient été réinoculés. Voici, en résumé, l'observation de chacun d'eux :

BOUVILLON n° 23. — Vacciné à l'âge de cinq jours avec 50 milligrammes de BCG sous la peau. Développement normal. Abattu neuf mois environ (deux cent soixante jours) après la vaccination, ayant été toujours en contact avec des animaux tuberculeux. *Autopsie* : absence totale d'altérations dans les viscères abdominaux et thoraciques (poumons et plèvre, foie, rate, reins). L'examen systématique des ganglions de la tête, du cou, des membres, aussi bien que celui des ganglions pariétaux et viscéraux des cavités thoracique et abdominale les trouve presque tous normaux. *Ganglions altérés* : a) un ganglion bronchique, avec un petit foyer d'infiltration calcaire ; b) un ganglion œsophagien du médiastin postérieur, de consistance dure, rugueux, criant à la coupe, avec trois petits nodules caséo-calcaires ; c) un ganglion rétro-pharyngien, augmenté de volume, dur et criant au scalpel, avec huit petits nodules en partie caséifiés, et des bâtonnets acido-résistants à l'examen direct.

BOUVILLON n° 15. — Vacciné vingt-quatre heures après la naissance avec 50 milligrammes de BCG, et laissé en contact avec bétail tuberculeux. Bon développement. Revacciné huit mois plus tard, encore avec 50 milligrammes de BCG. Abattu cinq mois après la revaccination, soit treize mois après la vaccination. *Autopsie* : pas de lésions spécifiques dans les viscères thoraciques et abdominaux (poumons et plèvre, foie, rate, reins). Foyers de broncho pneumonie aiguë non tuberculeuse. Réaction fibreuse dans le tissu cellulaire du fanon, au niveau du point d'inoculation du vaccin. Ganglions lymphatiques normaux, à l'exception des suivants : a) ganglion pré-scapulaire gauche dur, criant au scalpel, avec quelques petits foyers d'infiltration calcaire ; b) un ganglion œsophagien dur, rugueux à la coupe, avec un nodule en voie de caséification ; c) un ganglion bronchique dans les mêmes conditions ; d) un ganglion œsophagien avec trois nodules spéci-

TABLEAU I. — Vaccinations et revaccinations

| NUMÉRO | NAISSANCE | INOCULATIONS |
|--------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | | 1 |
| | | en milligrammes |
| 1 | 8 mars 1926. | 6 avril 1926 : 50. |
| 2 | 3 avril 1926. | 6 avril 1926 : 50. |
| 3 | 8 avril 1926. | 23 avril 1926 : 50. |
| 4 | 18 avril 1926. | 23 avril 1926 : 50. |
| 5 | 27 avril 1926. | 30 avril 1926 : 30. |
| 6 | 19 mai 1926. | 27 mai 1926 : 50. |
| 7 | 19 mai 1926. | 27 mai 1926 : 50. |
| 8 | 9 juin 1926. | 21 juin 1926 : 50. |
| 9 | 15 juillet 1926. | 23 juillet 1926 : 50. |
| 10 | 28 août 1926. | 4 septembre 1926 : 25. |
| 11 | 19 septembre 1926. | 26 septembre 1926 : 25. |
| 12 | 23 décembre 1926. | 29 décembre 1926 : 30. |
| 13 | 2 janvier 1927. | 3 janvier 1927 : 30. |
| 14 | 22 janvier 1927. | 22 janvier 1927 : 50. |
| 15 | 23 janvier 1927. | 24 janvier 1927 : 50. |
| 16 | 25 janvier 1927. | 28 janvier 1927 : 50. |
| 17 | 14 février 1927. | 17 février 1927 : 50. |
| 18 | 22 février 1927. | 3 mars 1927 : 50. |
| 19 | 6 mars 1927. | 11 mars 1927 : 50. |
| 20 | 15 avril 1927. | 3 mai 1927 : 50. |
| 21 | 22 mai 1927. | 27 mai 1927 : 50. |
| 22 | 30 mai 1927. | 1 ^{er} juin 1927 : 50. |
| 23 | 15 juin 1927. | 20 juin 1927 : 50. |
| 24 | 17 juin 1927. | 20 juin 1927 : 50. |
| 25 | 1 ^{er} juillet 1927. | 22 juillet 1927 : 50. |
| 26 | 3 août 1927. | 9 août 1927 : 50. |
| 27 | 29 août 1927. | 2 septembre 1927 : 50. |
| 28 | 20 septembre 1927. | 21 septembre 1927 : 50. |
| 29 | 30 septembre 1927. | 6 octobre 1927 : 50. |
| 30 | 6 octobre 1927. | 8 octobre 1927 : 50. |
| 31 | 12 octobre 1927. | 13 octobre 1927 : 50. |
| 32 | 22 octobre 1927. | 27 octobre 1927 : 50. |
| 33 | 13 novembre 1927. | 23 novembre 1927 : 50. |
| 34 | 17 novembre 1927. | 22 novembre 1927 : 50. |
| 35 | 28 janvier 1928. | 3 février 1928 : 100. |
| 36 | 31 janvier 1928. | 4 février 1928 : 100. |
| 37 | 4 février 1928. | 7 février 1928 : 100. |
| 38 | 15 février 1928. | 23 février 1928 : 50. |
| 39 | 18 février 1928. | 23 février 1928 : 100. |
| 40 | 25 février 1928. | 27 février 1928 : 100. |
| 41 | 25 février 1928. | 27 février 1928 : 100. |
| 42 | 3 mars 1928. | 6 mars 1928 : 100. |
| 43 | 5 mars 1928. | 6 mars 1928 : 50. |
| 44 | 25 mars 1928. | 27 mars 1928 : 100. |
| 45 | 3 avril 1928. | 7 avril 1928 : 100. |

Nota. — Le veau n° 1, en plus des quatre inoculations signalées ci-dessus, en a reçu une cinquième.

De même les veaux n°s 6 et 7 ont reçu encore :

N° 6 : 3 mai 1927 : 50 milligrammes; 26 janvier 1928 : 50 milligrammes.

N° 7 : 6 mai 1927 : 50 milligrammes; 26 janvier 1928 : 90 milligrammes.

PRÉMUNITION CONTRE LA TUBERCULOSE BOVINE PAR LE BCG 1485

jeunes bovins par le BCG.

CG.

| II | III | IV |
|-------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| en milligrammes | en milligrammes | en milligrammes |
| 9 mai 1926 : 50. | 4 septembre 1926 : 25. | 11 mars 1927 : 50. |
| 3 avril 1926 : 50. | Abattu le 10 décembre 1927. | |
| 9 mai 1926 : 50. | 3 mai 1927 : 50. | |
| 9 mai 1926 : 50. | 23 juillet 1926 : 50. | 28 août 1926 : 25. |
| 9 juin 1926 : 50. | 23 juillet 1926 : 50. | 28 août 1926 : 25. |
| 9 juin 1926 : 50. | 6 mai 1927 : 50. | 27 janvier 1928 : 90. |
| 3 juillet 1926 : 50. | 4 septembre 1926 : 25. | 1 ^{er} juin 1927 : 50. |
| 0 août 1926 : 50. | | |
| tu le 10 décembre 1927. | 7 avril 1928 : 100. | |
| 0 mai 1927 : 50. | 23 août 1927 : 50. | 27 février 1928 : 50. |
| 0 mai 1927 : 50. | | |
| tu le 10 décembre 1927. | 27 février 1928 : 58. | |
| 3 septembre 1927 : 50. | Abattu le 10 mars 1927. | |
| 3 septembre 1927 : 50. | 6 mars 1928 : 50. | |
| 3 août 1927 : 50. | 16 avril 1928 : 50. | |
| 3 novembre 1927 : 50. | | |
| 3 décembre 1927 : 50. | 16 avril 1928 : 50. | |
| 3 décembre 1927 : 50. | | |
| Abattu le 10 mars 1928. | | |
| 3 mars 1928 : 50. | | |
| 3 mars 1928 : 50. | | |
| Abattu le 10 mars 1928. | | |
| | | |
| 3 février 1928 : 50. | 23 juillet 1928 : 50. | |
| 7 février 1928 : 50. | | |
| 7 mars 1928 : 50. | 27 mars 1928 : 50. | |
| 7 février 1928 : 50. | | |
| | | |
| 7 mars 1928 : 50. | | |

igrammes le 22 décembre 1927.

tiques, non caséifiés. Ces ganglions ont été triturés ensemble dans l'eau physiologique et la suspension injectée par la voie sous-cutanée à 2 cobayes. Au bout de quarante jours, ces animaux ont été sacrifiés et reconnus avec lésions tuberculeuses en voie de généralisation.

BOUVILLON n° 3. — Agé de quinze jours lors de la vaccination avec 50 milligrammes de BCG. Cohabitation constante avec bétail tuberculeux, sans soins spéciaux. Revaccination vingt-six jours après la première inoculation. Développement normal. Abattu dix-huit mois et demi après la première inoculation. *Autopsie* : absence de lésions viscérales de nature tuberculeuse (poumons et plevre, foie, rate, reins). Système ganglionnaire normal, à l'exception des ganglions suivants : a) ganglions bronchiques durs et rugueux à la coupe, avec petits foyers d'infiltration tuberculeuse, révélant à l'examen microscopique de nombreuses cellules géantes et des signes de caséification; b) un ganglion œsophagien également rugueux sur la coupe, non caséifié. Les ganglions bronchiques altérés ont été triturés dans l'eau physiologique et l'émulsion injectée dans le péritoine d'un cobaye de 450 grammes, qui est mort quarante-quatre jours après, avec des lésions tuberculeuses dans les ganglions, la rate, le foie et les poumons.

BOUVILLON n° 20. — Vacciné avec 50 milligrammes de BCG dans le fanon, dix-huit jours après la naissance. Aspect et croissance normaux, en cohabitation continue avec des animaux tuberculeux. Sacrifié dix mois après la vaccination. *Autopsie* : viscères normaux, ganglions abdominaux presque tous normaux, de même les pharyngiens, les pré-cruraux et le pré-scapulaire gauche. *Ganglions altérés* : deux mésentériques, dont l'un renfermant un petit nodule de consistance dure et rugueuse et l'autre une lésion plus avancée, avec infiltration calcaire; b) un ganglion pré-scapulaire (droit) dur, avec un petit foyer en voie de caséification; c) deux ganglions bronchiques, dont l'un contenant un petit nodule et le second deux nodules bien caractéristiques. Les ganglions altérés ont été triturés ensemble dans l'eau physiologique; la suspension résultante ayant été inoculée par voie sous-cutanée à 2 cobayes. Au bout de quarante jours, les animaux ont été sacrifiés et on a trouvé chez les deux des lésions tuberculeuses généralisées.

BOUVILLON n° 13. — Vacciné le lendemain de la naissance avec 30 milligrammes de BCG et abandonné en milieu contaminé. Sacrifié onze mois après l'inoculation, ayant accusé un développement normal. *Autopsie* : viscères reconnus indemnes de lésions tuberculeuses. Système ganglionnaire presque totalement dépourvu de lésions de tuberculose, à l'exception de deux ganglions œsophagiens durs et rugueux à la coupe et dans lesquels l'examen microscopique décèle de nombreuses cellules géantes et des follicules tuberculeux caractéristiques. Ces ganglions, émulsionnés dans l'eau physiologique, ont tuberculisé un cobaye, par inoculation péritonéale.

BOUVILLON n° 10. — Agé de sept jours lors de la vaccination avec 25 milligrammes de BCG et laissé en étroite cohabitation avec des animaux tuberculeux. Bon développement. Sacrifié quinze mois plus tard, dans d'excellentes conditions de santé apparente. *Autopsie* : pas de lésions tuberculeuses dans les viscères. Système ganglionnaire des cavités thoracique et abdominale des membres et sous-cutané sans lésions spécifiques de tuberculose. *Altéré* : un seul ganglion du pharynx, augmenté de volume, dur et renfermant un nodule en voie de caséification.

Analysant les faits précédents, on voit que les bouvillons n°s 23 et 15 ont été vaccinés d'accord avec les prescriptions de Calmette et Guérin (1), surtout dans les conditions rapportées par Guérin, Richart et Boissière (2). Le bouvillon n° 3 a été vacciné à la limite du délai établi dans les travaux des mêmes auteurs. Celui du n° 20 a été inoculé un peu tardivement (dix-huit jours après la naissance); les veaux n°s 13 et 10, vaccinés précocement, ont reçu des doses un peu inférieures à celles recommandées par Calmette et ses collaborateurs.

Malgré ces variations, tous les animaux vaccinés ont montré jusqu'au jour de l'abatage la même vigueur et un développement de tous points normal. Les manifestations cliniques de la tuberculose, si fréquemment observées sur les génisses de cet élevage avant la vaccination par le BCG, ne sont pas réapparues depuis l'institution de cette mesure.

On doit signaler encore comme un fait très important que, dans les viscères de tous les animaux abattus, nous ne sommes pas parvenus à découvrir la moindre lésion tuberculeuse, indépendamment de la dose prémunisante et du temps écoulé depuis la vaccination. Ainsi, chez le bouvillon n° 10, vacciné le septième jour après la naissance avec 25 milligrammes de germes et abattu quinze mois plus tard, sans revaccination, nous n'avons trouvé que des lésions ganglionnaires minimales.

Les lésions ganglionnaires discrètes et, en général, peu nombreuses, mais constantes dans toutes les autopsies que nous avons faites, servent évidemment à témoigner la contamination permanente du milieu. Cela a même rendu indispensable la présence d'animaux témoins non vaccinés, dont l'utilité n'eût pu être que relative à la rapidité et au degré d'invasion de la maladie. L'aspect macro- et microscopique des lésions ganglionnaires, aussi bien que leur aptitude à provoquer une infection généralisée chez le cobaye et s'accompagnant d'altérations caractéristiques, prouvent l'existence et l'activité pathogène des bacilles bovins provenant de l'ambiance. Il ne faut pas admettre ici qu'on puisse attribuer les lésions rencontrées au BCG, comme on l'a théoriquement insinué quelquefois, ces lésions étaient absentes au point même des

(1) *Loco cit.*

(2) *Loco cit.*

inoculations et dans les ganglions du voisinage, malgré l'emploi de hautes doses du germe. D'un autre côté, les nombreuses inoculations de BCG que nous avons pratiquées au cours de deux années, dans le péritoine du cobaye, ont échoué à produire des lésions tuberculeuses réinoculables (1).

En somme, dans les conditions établies dans les essais que nous venons de rapporter et consistant dans l'inoculation du BCG à des bovins nouveau-nés qui ont été laissés ensuite en étroite cohabitation tuberculeuse, sans soins spéciaux d'alimentation, nous sommes parvenus à éliminer les manifestations cliniques et les lésions viscérales de la tuberculose. L'invasion du système ganglionnaire par des bacilles virulents et activement destructeurs a été réduite d'une façon évidente à presque un minimum; cependant, on n'a pu achever la saturation du système lymphatique jusqu'au point d'empêcher totalement l'activité pathogène des bacilles virulents du milieu ambiant.

NOTA. — A différentes époques, postérieures au début de nos essais, Guérin (*Rec. de Méd. Vétérin.*, 103, 1927, 400), puis Calmette et Guérin (*Ibid.*, 104, 81 et ces *Annales*, 42, 175) ont insisté sur la nécessité de soustraire au milieu infecté les jeunes bovins vaccinés, pendant le mois qui suit leur vaccination, celle-ci devant être tentée le plus tôt possible après la naissance. Pendant la même période, l'alimentation des vaccinés devra être faite avec du lait non bacillifère.

(1) *Bol. do Inst. Vital Brazil*, n° 2, décembre 1927.

Le Gérant : G. MASSON.

